



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ**

**VALÉRIA ROSA LOPES**

**MELHORAMENTO GENÉTICO DE CANA-DE-AÇÚCAR EM  
ASSOCIAÇÃO COM BACTÉRIAS PROMOTORAS DO  
CRESCIMENTO VEGETAL**

**CURITIBA**

**2013**

**VALÉRIA ROSA LOPES**

**MELHORAMENTO GENÉTICO DE CANA-DE-AÇÚCAR EM  
ASSOCIAÇÃO COM BACTÉRIAS PROMOTORAS DO CRESCIMENTO  
VEGETAL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de Concentração em Produção Vegetal, Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo, Setor de Ciências Agrárias, da Universidade Federal do Paraná, como parte das exigências para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Orientador: Dr. João Carlos Bespalhok Filho

**CURITIBA**

**2013**

## TERMO DE APROVAÇÃO



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
AGRONOMIA - PRODUÇÃO VEGETAL



### PARECER

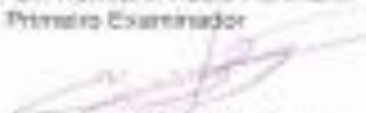
Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Agronomia - Produção Vegetal, reuniram-se para realizar a arguição da Tese de DOUTORADO, apresentada pela candidata VALERIA ROSA LOPES, sob o título "MELHORAMENTO GENÉTICO DE CANA-DE-AÇÚCAR EM ASSOCIAÇÃO COM BACTÉRIAS PROMOTORAS DO CRESCIMENTO VEGETAL", para obtenção do grau de Doutor em Ciências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia - Produção Vegetal do Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná.

Após haver analisado o referido trabalho e arguido a candidata são de parecer pela "APROVAÇÃO" da Tese.

Curitiba, 26 de Fevereiro de 2013.

  
Professora Dra. Lourdes Larissa May De Mello  
Coordenadora do Programa

  
Professor Dr. Hermann Paulo Hoffmann  
Primeiro Examinador

  
Professor Dr. Edson Pinheiro Guerra  
Segundo Examinador

  
Professor Dr. José Luis Camargo Zambor  
Terceiro Examinador

  
Professor Dr. Ricardo Augusto de Oliveira  
Quarto Examinador

  
Professor Dr. João Carlos Bessaihol Filho  
Presidente da Banca e Orientador

## AGRADECIMENTOS

Muitos foram aqueles que auxiliaram na elaboração deste trabalho ao longo destes quatro anos. Alguns de forma direta, mas muitos de forma indireta. Difícil citar todos eles, mas tenho a certeza de que todos, mesmo que não lembrados, sabem a importância que tiveram nessa fase da minha vida e na finalização de mais essa etapa.

Em primeiro, a Deus que sempre me guiou e colocou as pessoas e oportunidades certas em meu caminho;

Aqueles que ajudaram diretamente:

Ao meu orientador João Carlos Bespalhok Filho pela orientação, pela infinita paciência, calma e tranquilidade, confiança, auxílio, ensinamentos e por tantas outras coisas... tenho certeza que sou privilegiada de ter uma pessoa tão humana e correta como orientador!

Aos professores Edelclaiton Daros, José Luis Camargo Zambom e Ricardo Augusto Oliveira, pelo auxílio e ensinamentos dados durante todos estes anos de mestrado e doutorado, e pelas correções e sugestões na pré-defesa.

Ao professor Biasi que permitiu que realizasse parte dos meus experimentos no Laboratório de Micropropagação de Plantas.

Aos funcionários da Estação Experimental de Paranavaí: Cláudio, Ismair, Alexandre, Benega, Neca, Diego, Joca, Sr. Zé e a Verinha; aos pesquisadores do Programa de Melhoramento Genético de Cana-de-Açúcar da UFPR (PMGCA/UFPR), Heroldo, Guilherme e Pedro; aos técnicos, Fabinho, Alessandro, Wellington, José Batista (Mineiro), Alexandre (Gordo) e Aílto; e aos residentes Pedro e Reginaldo.

A amiga Lúcia pelos valiosos ensinamentos e conhecimento compartilhado sobre microbiologia, sem os quais não teria conseguido concluir este trabalho.

A colega Luíza do Departamento de Bioquímica e ao Willian da Embrapa Agrobiologia, pelo auxílio no preparo e aplicação dos inoculantes.

Ao colega e amigo Guilherme pelas discussões, opiniões, e por compartilhar comigo as informações e conhecimentos nessa nova área a qual resolvemos nos dedicar. Tenho certeza que seu trabalho e dedicação ainda trarão a você muitas oportunidades!

Aos colegas Luiz José, Luiz Cláudio, Geraldo e Iaia, os “*canassauros*”, pelos muitos ensinamentos sobre cana-de-açúcar.

Aos colegas e amigos Ana Selenia, Cissa, João Civiero e Ana Cláudia pela ajuda nas avaliações e por tornarem essa fase menos difícil e mais divertida!

Aos estagiários, Algione, Frederico, Fernando, Caroline e Franciele, pela ajuda nas tarefas do laboratório.

Aos amigos do laboratório de Micropropagação de Plantas, Vanessa. Caroline, Cassiana, Lais, Paulo, Giovana, Marília, Bruna e tantos outros que por lá passaram, pelas conversas, amizade, auxílio e companhia, que tornaram tudo mais fácil e agradável.

A todos os demais professores da Pós-Graduação em Produção Vegetal pelos ensinamentos, dedicação e compromisso com a educação.

Aos servidores, Sr. Rainerio, Clélia, Lucimara e Maria Emília pelo profissionalismo e prestatividade de sempre.

Aqueles que não auxiliaram diretamente na elaboração do trabalho, mas sem os quais eu não conseguiria concluí-lo:

Aos meus irmãos George, Fernanda, Claudia e Graziela por me ouvirem, por saberem compreender as minhas dificuldades, mesmo não entendendo nada sobre cana-de-açúcar e bactérias, e por me apoiarem sempre!

A minha “hermana” Yohana, que me aturou durante todo o doutorado. Como agradecer pela parceria nos trabalhos, nos estudos e no laboratório, os inúmeros almoços, cafés, sucos e happy hour’s acompanhados de discussões, conversas e muitas risadas. Só tenho a agradecer a Deus por sua grande amizade!

As amigas e colegas Mariane, Elis, Melícia e Cissa, pelas conversas, amizade e por estarem presente, mesmo longe.

Aos meus eternos anjos da guarda, Roberta, Neide, Jonas, Suzana e Simone, que sempre me apoiaram, me incentivaram e acreditaram em mim, até mais do que deveriam!

Aos demais amigos e familiares, que renderiam uma imensa lista se citados aqui, pelas horas de descontração, pela compreensão e pelo apoio.

## DEDICATÓRIA

A minha mãe Siluá (*in memoriam*),  
exemplo de coragem, caráter, dedicação,  
honestidade, força e tantas outras  
qualidades que fazem me orgulhar de ser  
sua filha.

Ao meu pai Manuel pelo exemplo de  
caráter e honestidade, e por sempre  
incentivar-me a estudar.

## RESUMO

A cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) é uma cultura de grande importância econômica no Brasil, sendo considerada uma das melhores opções dentre as fontes de energia renováveis. Por ser uma Poacea com alta produção de biomassa, precisa de altas doses de adubos nitrogenados para o seu desenvolvimento, o que aumenta de forma significativa o custo de produção. Porém, existem bactérias capazes de fixar o nitrogênio da atmosfera, e quando associadas com as Poaceas promovem o desenvolvimento vegetal, reduzindo a necessidade de adubos, incluindo os nitrogenados. Entretanto, a capacidade dessas bactérias em promover esses efeitos é dependente da interação planta-bactéria, uma vez que o genótipo vegetal tem grande influência no sucesso da associação. Dessa forma, este trabalho teve como objetivo estudar a resposta de diferentes famílias de cana-de-açúcar e clones selecionados a partir dessas famílias, quanto à resposta à inoculação com bactérias promotoras do crescimento vegetal (PGPB) e fixadoras de nitrogênio, servindo como subsídios a futuros trabalhos de seleção e melhoramento genético de cana-de-açúcar visando a melhor associação com esse tipo de microrganismo. Foram utilizadas 54 famílias da série 2008 em um experimento instalado em 2009 (Experimento 1); e 27 famílias da série 2009 em um experimento realizado em 2010 (cana-planta) e 2011 (cana-soca) (Experimento 2). Vinte clones provenientes das 54 famílias da série 2008 foram selecionados e levados para a próxima fase de seleção, nos anos de 2011 e 2012 (Experimento 3). Plantas provenientes da série 2008 e clones selecionados a partir destas plantas foram tratados com inoculantes a base de estirpes de *Azospirillum brasilense* (Experimentos 1 e 3), enquanto famílias provenientes da série 2009 foram tratadas com inoculante a base de *A. brasilense* ou por um mix constituído por cinco espécies de PGPB (*Gluconacetobacter diazotrophicus* Pal5, *Azospirillum amazonense* CBAmC, *Burkholderia tropica* Ppe8, *Herbaspirillum rubrisubalbicans* HCc103 e *Herbaspirillum seropedicae* HRC54) (Experimento 2). Para análise dos Experimentos 1 e 2 utilizaram-se caracteres biométricos (número de colmos, estatura, diâmetro do colmo e brix) e para o Experimento 3, além dos caracteres biométricos, foram usados caracteres tecnológicos (pol, pureza, fibra, ATR, AR), análise do teor de nitrogênio e população de bactérias presente nas raízes e rizomas. Em plantas provenientes de sementes (Experimentos 1 e 2) verificou-se resposta positiva e significativa na interação família-bactéria para o caractere brix e diâmetro de colmo. Também foi verificada a resposta dos tratamentos para estatura, diâmetro do colmo e brix, bem como resposta significativa do genótipo vegetal para todos os caracteres avaliados em cana-planta e soca. No Experimento 3 houve resposta diferenciada entre os clones, dependendo do tratamento e genótipo, sendo que o *ranking* dos melhores clones também foi alterado dependendo do caractere avaliado. O mesmo resultado foi verificado para a análise tecnológica e de nitrogênio. Observou-se a presença de bactérias durante todo o ciclo da cultura (Experimento 3) em todos os tratamentos avaliados, não havendo diferença significativa entre a população, tanto para as diferentes épocas de coleta quanto para os diferentes tratamentos. O caractere brix mostrou ser importante na avaliação da interação família-bactéria em cana-de-açúcar e, a inoculação uma boa ferramenta no auxílio à seleção na fase inicial do programa de melhoramento de cana-de-açúcar. Recomenda-se a continuidade de estudos em diferentes etapas do programa de melhoramento genético de cana-de-açúcar.

**Palavras-chave:** PGPB, FBN, interação planta-bactéria, famílias de cana-de-açúcar, *Saccharum* spp.

## **Sugarcane breeding aiming response to association with plant growth promoting bacteria**

### **ABSTRACT**

Sugarcane is a crop that has big economic value in Brazil, it's one of the best fonts of renewable energy. Because it is a Poacea with a high biomass production this crop needs high doses of nitrogen fertilizers for its development, which increase significantly the cost production. However there are bacteria capable to fix nitrogen, when associated with the graminaceous plants, promoting the plant growth and reducing the necessity of the nitrogen fertilization. Nevertheless the capacity of the bacteria to fix nitrogen and promote the plant growth is dependent on the plant bacteria interaction, once the vegetal genotype has a big influence on the success of the association. Thus this work had the aim to study the response of different sugarcane families and clones selected from these families to inoculation with Plant Growth Promoting Bacteria (PGPB) and nitrogen fixing bacteria, providing informations to the future work of sugarcane breeding and selection for better association with this type of microorganism. Seeds of 54 sugarcane families of the 2008 serie's were used in an experiment installed in 2009 (Experiment 1) and 27 families of the 2009 series used in an experiment conducted in 2010 (plant) and 2011 (first ratoon) (Experiment 2). 20 clones derived from those 54 initial families were selected from the 2008 series and led to a new phase of evaluation in 2011 and 2012 (Experiment 3). Plants from 2008 series were treated with the inoculants prepared with different *Azospirillum brasilense* strains (Experiments 1 and 3), while clones from the 2009 series were treated with one *A. brasilense* inoculant or a mix composed of five species of PGPB (*Gluconacetobacter diazotrophicus* Pal5, *Azospirillum amazonense* CBAmC, *Burkholderia tropica* Ppe8, *Herbaspirillum rubrisubalbicans* HCc103 and *Herbaspirillum seropedicae* HRC54) (Experiment 2). Biometric characters (number of stems, plant stature, diameter of the stem and brix) were used for statistical analysis of Experiments 1 and 2. For the Experiment 3 beyond the biometrical analyses, technological properties (pol, purity, fiber, ATR, AR), analysis of nitrogen content and bacterial population present on roots and rhizomes were used. Plants originated from seeds (experiments 1 and 2) presented a positive and significant response for family-bacteria interaction for the character brix and stem diameter. Significant values were observed to treatment effect for average height, stem diameter and brix. Significant values were observed for the genotype effect for all characters and in both evaluations. On Experiment 2 the response was different among the clones depending on the genotype and treatment. The ranking of best clones were changed depending on the treatment and the character evaluated. The same result was observed for the analysis of nitrogen and technology analyses. The presence of bacteria was detected throughout the crop cycle (Experiment 3) in all treatments, with no significant difference in the population, for the different periods of collection and different treatments. The character brix proved to be important in the evaluation of interaction in sugarcane families and the inoculation show to be a good tool to aid the selection at this stage. It is recommended to continue these studies with this goal in other phases of selection.

**Key-word:** PGPB, FBN, plant-bacteria interaction, sugarcane families, *Saccharum* spp.



## LISTA DE FIGURAS

### Capítulo I

Figura 1: Valores genotípicos de brix (A) e diâmetro de colmo (B) de 54 famílias de cana-de-açúcar de acordo com os tratamentos utilizados (não inoculado, inoculado com Triazo e inoculado com IC26), 14 meses após o plantio. .... 62

### Capítulo II

Figura 1: Valores de Interação família x tratamento para o caractere brix, de 27 famílias de cana-de-açúcar em relação aos três tratamentos utilizados (não inoculado, inoculado com Triazo e inoculado com IC26), em duas épocas de avaliação, cana-planta e cana-soca. .... 81

Figura 2: Valores médios de brix de 27 famílias de cana-de-açúcar em relação aos três tratamentos utilizados, em duas épocas de avaliação, cana-planta e cana-soca. .... 82

### Capítulo III

Figura 1: Teores de nitrogênio na folha +1 em 20 clones de cana-de-açúcar. Amostras coletadas 9 meses após o plantio em ciclo de cana-soca. .... 103

Figura 2: População de bactérias da espécie *Azospirillum brasilense* em amostras de raiz e rizoma coletadas a cada 4 meses, ao longo de dois anos de cultivo, cana-planta (A) e cana-soca (B), de acordo com os diferentes tratamentos. Valores em log do número de cfu.g<sup>-1</sup> de tecido. .... 104

Figura 3: Valores médios da população de bactéria de acordo com o tratamento utilizado, não inoculado, IC26 e Triazo, no rizoma e raiz de clones de cana-de-açúcar. Média feita com base em 21 amostras e 7 coletas. .... 106

## LISTA DE TABELAS

### Capítulo I

Tabela 1: Propriedades químicas do solo (0-40 cm) no estabelecimento do experimento.....	54
Tabela 2: Relação das 54 famílias utilizadas e cruzamento de origem. ....	54
Tabela 3: Resultados da análise de variância para os caracteres: número de colmos por touceira (NCT), estatura da planta (EST), diâmetro do colmo (DIA) e brix médio, após 14 meses. ....	58
Tabela 4: Resultado dos tratamentos para os caracteres: número de colmos por touceira (NCT), estatura da planta (EST), diâmetro do colmo (DIA) e brix médio, após 14 meses. ....	58
Tabela 5: Valor genotípico (VG) das 10 melhores famílias, para os caracteres: número de colmos por touceira (NCT), estatura da planta (EST), diâmetro do colmo (DIA) e brix médio, após 14 meses. ....	59
Tabela 6: Resumo das 10 melhores famílias (com o respectivo valor genotípico) para as características brix médio e diâmetro do colmo, bem como o valor correspondente da interação família x tratamento (FxT), após 14 meses.....	60

### Capítulo II

Tabela 1: Relação das 27 famílias utilizadas e cruzamento de origem. ....	75
Tabela 2: Resultados da análise de Deviance para os caracteres: número de colmos por touceira (NCT), estatura da planta (EST), diâmetro do colmo (DIA) e brix médio, em cana-planta e cana-soca.....	79
Tabela 3: Média dos caracteres avaliados nas 27 famílias de cana-de-açúcar de acordo com os tratamentos usados, em cana-planta e cana-soca.....	80

### Capítulo III

Tabela 1: Valores médios para o teor de nitrogênio presente no solo antes da implantação do experimento. ....	94
Tabela 2: Relação de clones selecionados com o número recebido (identificação) e a família de origem (família da qual foi selecionado em T1).....	95
Tabela 3: Relação de amostras retiradas ao longo do experimento para o reisolamento das bactérias, número dos respectivos clones e meses de coleta em cana-planta.....	98
Tabela 4: Valores de correlação de <i>Spearman</i> entre os tratamentos, para os caracteres	

biométricos analisados nos 20 clones de cana-de-açúcar, dados de cana-planta e cana-soca. Estatura da planta (EST), diâmetro do colmo (DIA), brix, número de colmos por metro (NCM) e massa média de 10 colmos (M10).....	99
Tabela 5: Valores de correlação de <i>Spearman</i> entre os tratamentos, para os caracteres tecnológicos analisados nos 20 clones de cana-de-açúcar, dados de cana-planta e cana-soca... ..	101
Tabela 6: Teores médios de nitrogênio na folha +1 dos 20 clones de cana-de-açúcar, aos 9 meses de idade, de acordo com os tratamentos analisados - cana-soca. Valores expressos em g kg <sup>-1</sup> .....	102

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL .....	15
2. REVISÃO DE LITERATURA .....	19
2.1 A CULTURA NA CANA-DE-AÇÚCAR E SUA IMPORTÂNCIA ECONÔMICA .....	19
2.2 CENTRO DE ORIGEM DA CANA-DE-AÇÚCAR, CLASSIFICAÇÃO BOTÂNICA E CARACTERÍSTICAS .....	20
2.3 A CULTURA DE CANA-DE-AÇÚCAR E A ADUBAÇÃO NITROGENADA .....	21
2.4 BACTÉRIAS PROMOTORAS DO CRESCIMENTO VEGETAL .....	22
2.4.1 Bactérias Fixadoras de Nitrogênio .....	24
2.5 BACTÉRIAS PROMOTORAS DO CRESCIMENTO VEGETAL ASSOCIADAS À CANA-DE-AÇÚCAR .....	25
2.5.1 Bactérias endofíticas obrigatórias.....	25
2.5.1.1 <i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i> .....	25
2.5.1.2 <i>Herbaspirillum</i> spp. ....	26
2.5.1.3 <i>Burkholderia</i> spp. ....	27
2.5.2 Bactérias endofíticas facultativas .....	28
2.5.2.1 <i>Azospirillum</i> spp. ....	28
2.5.3 Bactérias de vida livre .....	30
2.6 INOCULANTES .....	31
2.7 INTERAÇÃO PLANTA-BACTÉRIA .....	32
2.8 CULTIVARES DE CANA-DE-AÇÚCAR RESPONSIVAS A PGPB E O MELHORAMENTO GENÉTICO .....	34
3. REFERÊNCIAS .....	37
CAPÍTULO I - SELEÇÃO DE FAMÍLIAS DE CANA-DE-AÇÚCAR COM MELHOR ASSOCIAÇÃO A RIZOBACTÉRIAS PROMOTORAS DO CRESCIMENTO VEGETAL (PGPR).....	50
RESUMO.....	50
ABSTRACT .....	50
4.1 INTRODUÇÃO.....	51
4.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	52
4.2.1 Local de instalação do experimento .....	52
4.2.2 Material vegetal .....	53

4.2.3 Estirpes utilizadas .....	54
4.2.4 Inoculantes .....	54
4.2.5 Inoculação.....	55
4.2.6 Delineamento experimental .....	55
4.2.7 Avaliações .....	55
4.2.8 Análise estatística .....	56
4.3 RESULTADOS .....	56
4.3.1 Interação família x tratamento .....	61
4.4 DISCUSSÃO .....	61
4.4.1 Diferença genética entre as famílias .....	61
4.4.2 Efeito da inoculação no desenvolvimento das plantas .....	61
4.4.3 Aumento no teor de sólidos solúveis (brix) nas plantas .....	63
4.4.4 Interação família x tratamento .....	64
4.5 CONCLUSÕES .....	65
4.6 REFERÊNCIAS .....	66
CAPÍTULO II - INTERAÇÃO DE FAMÍLIAS DE CANA-DE-AÇÚCAR COM DOIS INOCULANTES A BASE DE BACTÉRIAS PROMOTORAS DO CRESCIMENTO VEGETAL, EM CANA-PLANTA E CANA-SOCA.....	71
RESUMO.....	71
ABSTRACT .....	71
5.1 INTRODUÇÃO.....	72
5.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	73
5.2.1 Local de instalação do experimento .....	74
5.2.2 Material vegetal .....	74
5.2.3 Inoculantes utilizados .....	75
5.2.4 Inoculação.....	75
5.2.4.1 <i>Inoculação em cana-planta</i> .....	75
5.2.4.2 <i>Inoculação em cana-soca</i> .....	76
5.2.5 Delineamento experimental .....	76
5.2.6 Avaliações .....	77
5.2.7 Análise estatística .....	77
5.3 RESULTADOS .....	78
5.4 DISCUSSÃO .....	82
5.5 CONCLUSÕES .....	85
5.6 REFERÊNCIAS .....	86
CAPÍTULO III - RESPOSTA DE CLONES DE CANA-DE-AÇÚCAR A INOCULAÇÃO COM ESTIRPES DE <i>Azospirillum brasilense</i> NA FASE T2 DE UM PROGRAMA DE	

MELHORAMENTO GENÉTICO.....	90
RESUMO.....	90
ABSTRACT .....	90
6.1 INTRODUÇÃO.....	91
6.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	92
6.2.1 Local de instalação do experimento .....	92
6.2.2 Material vegetal .....	93
6.2.3 Campo experimental e tratamentos .....	93
6.2.3.1 <i>Tratamentos</i> .....	94
6.2.4 Estirpes utilizadas e inoculantes .....	95
6.2.5 Inoculação.....	95
6.2.6 Avaliações .....	95
6.2.6.1 <i>Análise Biométrica</i> .....	95
6.2.6.2 <i>Análise Tecnológica</i> .....	96
6.2.6.3 <i>Análise do teor de nitrogênio nas folhas</i> .....	96
6.2.6.4 <i>Reisolamento da população de bactérias da espécie Azospirillum brasilense</i> .....	96
6.2.7 Análise estatística .....	97
6.3 RESULTADOS .....	98
6.3.1 Análise Biométrica .....	98
6.3.2 Análise Tecnológica .....	99
6.3.3 Análise de Nitrogênio.....	100
6.3.4 Reisolamento das bactérias.....	101
6.3.4.1 <i>População das bactérias ao longo dos dois ciclos de cultivo</i> .....	102
6.3.4.2 <i>População de bactérias da espécie Azospirillum brasilense em raízes e rizomas dos clones de cana-de-açúcar</i> .....	103
6.4 DISCUSSÃO.....	104
6.4.1 Análise biométrica.....	104
6.4.2 Análise tecnológica.....	106
6.4.3 Análise de Nitrogênio.....	107
6.4.4 Comportamento da população das bactérias ao longo dos dois ciclos de cultivo .....	109
6.5 CONCLUSÕES .....	109
6.6 REFERÊNCIAS .....	111
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	114
ANEXO I.....	117
ANEXO II.....	128
ANEXO III .....	131

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

A cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) é uma das mais importantes espécies cultivadas comercialmente nos trópicos e subtropicais, e atualmente uma das melhores opções dentre as fontes de energia renováveis (BONNETI et al., 2004; MANNERS et al., 2004). No Brasil, possui elevada importância econômica e ambiental (MATSUOKA et al., 2005), ocupando uma área de 8.527 mil hectares e uma produção de 596.629 mil toneladas, segundo dados da Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB) para a safra, 2012/2013 (CONAB, 2012).

Atualmente o mercado da cana-de-açúcar apresenta-se em expansão devido, principalmente, ao aumento do consumo de etanol, como forma de combustível em substituição à gasolina, sendo possível acrescentar a este fato, a maior preocupação com o meio ambiente e a redução das reservas mundiais de petróleo. A necessidade de suprir essa demanda crescente do mercado torna necessária a busca por melhores variedades de cana-de-açúcar, com maior produtividade, reduzindo custos e mão-de-obra entre outras características.

A cana-de-açúcar é uma cultura propagada vegetativamente através de colmos e produz uma grande quantidade de biomassa, o que demanda uma grande aplicação de nutrientes, principalmente nitrogênio.

Corroborando com essa informação, Fuentes-Ramirez et al. (1999) mencionam que, na época em que realizaram seu estudo, na maioria dos países onde a cana-de-açúcar é cultivada, uma prática agrícola comum é a aplicação de 250 kg de N por hectare ou mais, o que significa um alto custo para a sua produção. O custo com os adubos nitrogenados ficou ainda maior com a atual crise do petróleo, pois esse é utilizado como matéria prima para a produção de adubos nitrogenados. Nesse sentido, alternativas com o objetivo de reduzir o uso de adubos nitrogenados são necessárias.

De acordo com os mesmos autores, no Brasil, os produtores têm usado quantidades inadequadas de fertilizantes, sendo insuficientes para repor as perdas ocorridas pela colheita (exportação de nutrientes), sugerindo que a fixação biológica de nitrogênio (FBN) tem contribuído para a nutrição dessas plantas. Estudos recentes mostram que na cultura da cana-de-açúcar encontram-se, frequentemente, bactérias diazotróficas associativas dos gêneros *Azospirillum*, *Beijerinckia*, *Herbaspirillum*, *Burkholderia* e *Gluconacetobacter* e, diferentes

pesquisas demonstraram a eficiência dessas bactérias em promover a FBN nessas plantas (BALDANI e BALDANI, 2005).

Estima-se que, em algumas variedades de cana-de-açúcar, a contribuição da FBN promovida por essas bactérias pode chegar a até 70% do total de nitrogênio na planta (MUÑOS-ROJAS e CABALLERO-MELLADO, 2003). Outra vantagem é que além de fixar o nitrogênio da atmosfera, estas bactérias podem produzir substâncias promotoras de crescimento, giberilina e auxina, que favorecem o desenvolvimento da planta e consequentemente aumentam a sua produtividade (MARIN et al., 1999; NOGUEIRA et al., 2001).

Entretanto, essas bactérias são associativas, ou seja, vivem no interior dos tecidos vegetais, nos espaços intercelulares, próximas às raízes e no solo, não formando uma estrutura específica na planta, como é o caso do *Rizhobium*. Dessa forma a eficiência dessas bactérias em fixar o nitrogênio é reduzida, uma vez que a maior concentração de oxigênio nesses ambientes reduz a eficiência da enzima nitrogenase.

Diferentes trabalhos mostram que o efeito de bactérias associativas é dependente do genótipo da planta, da espécie e estirpe da bactéria, da presença de outros microrganismos e das condições ambientais (BALDANI e BALDANI, 2005) e que o aumento da interação planta-bactéria pode aumentar a FBN. Vários autores têm reportado a importância do genótipo vegetal nessa associação com cana-de-açúcar e também com outras espécies não leguminosas, como milho (MENDONÇA et al., 2006; LOPES et al., 2008), trigo (SALA et al., 2007) e arroz (LADHA et al., 1987).

Reis Júnior et al. (2000) quantificaram a presença de várias espécies e estirpes de bactérias endofíticas em quatro cultivares micropropagadas de cana-de-açúcar e verificaram que as mesmas apresentavam respostas distintas à inoculação com bactérias diazotróficas. Esses autores não verificaram grande variação na população de bactérias nos tecidos das cultivares testadas, levando à hipótese de que a diferença na FBN poderia ter sido devido ao efeito do genótipo da cana-de-açúcar.

Muños-Rojas e Caballero-Mellado (2003) também encontraram respostas diferentes na porcentagem de nitrogênio fixado quando avaliaram três cultivares de cana-de-açúcar (MEX 57-473, MY 55-14 e CP 72-2086) inoculadas com diferentes estirpes de *Gluconacetobacter diazotrophicus*, atribuindo esta variação à interação planta-bactéria. Oliveira et al. (2006) comparando a resposta de duas cultivares de cana-de-açúcar (SP70-1143 e SP81-3250) à inoculação com diferentes espécies de bactérias diazotróficas, também encontraram grande influência do genótipo vegetal na resposta à inoculação.



Uma das explicações para estes resultados é a interação entre planta-bactéria que promoveria maior fixação de nitrogênio e promoção do crescimento vegetal, quando determinada estirpe de bactéria fosse combinada com determinada variedade “responsiva”.

Outro exemplo dessa delicada interação na cana-de-açúcar é com a espécie de bactéria *Herbaspirillum rubrisubalbicans*, que provoca a doença chamada de estria mosqueada, apenas em cultivares suscetíveis, como a B4362. Em outras cultivares, embora haja a infecção dos tecidos pela bactéria, não se verificam os sintomas característicos da doença (BALDANI et al., 1997).

No entanto, os trabalhos visando desenvolver metodologias para a inoculação de bactérias diazotróficas em cana-de-açúcar têm dado maior ênfase na seleção e utilização de diferentes espécies e estirpes de bactéria, sem trabalhar na seleção de genótipos mais responsivos à inoculação.

Em soja, a seleção de genótipos mais responsivos à inoculação com bactérias fixadoras de nitrogênio é uma das responsáveis pela atual redução no uso de adubos nitrogenados nessa cultura. Hungria et al. (1994) mencionam que o uso de genótipos de soja melhorados, associados à inoculação com bactérias fixadoras de nitrogênio do gênero *Bradyrhizobium*, foram responsáveis por uma economia de cerca de 1 bilhão de dólares por ano ao país, de acordo com dados coletados na época em que foi realizado o estudo. Essa economia só foi possível graças ao programa de seleção e melhoramento da soja no Brasil, que levou em consideração a capacidade da planta em fixar nitrogênio, permitindo que a soja seja cultivada apenas com o uso de inoculante, sem a suplementação com fertilizante nitrogenado.

A cana-de-açúcar é uma espécie de propagação vegetativa, poliploide e altamente heterozigota. O melhoramento genético da cana-de-açúcar baseia-se na seleção e clonagem de genótipos superiores de populações segregantes, obtidas por meio de cruzamentos sexuais entre indivíduos diferentes (MATSUOKA et al., 2005).

Os programas de melhoramento de cana-de-açúcar visam à obtenção de genótipos altamente produtivos, resistentes a doenças e com boa adaptabilidade a diferentes ambientes. O processo para a obtenção de novas cultivares é longo e caro, constituído por várias etapas, onde em cada uma delas procura-se identificar clones promissores. Uma grande quantidade de indivíduos é descartada a cada etapa, sendo que apenas uma pequena porcentagem de clones chega até as etapas finais. Geralmente o tempo gasto entre a realização do cruzamento e a liberação comercial das variedades varia de acordo com o programa de melhoramento genético, mas esse tempo é em média de 12 a 15 anos (LANDELL et al., 1999; CALIJA et al.,

2001; KIMBENG e COX, 2003).

Embora muitos trabalhos tenham sido desenvolvidos estudando esta relação planta-bactéria, a busca de genótipos mais responsivos à inoculação com bactérias diazotróficas não está entre os objetivos dos programas de melhoramento. Apesar disso, a seleção indireta para genótipos com maior capacidade de interação pode estar ocorrendo, quando a seleção é feita em ambientes menos favoráveis, principalmente em solos com baixa quantidade de nitrogênio. Sendo assim, a seleção de variedades de cana-de-açúcar responsivas à inoculação com bactérias diazotróficas seria uma alternativa no aumento da fixação biológica de nitrogênio e aumento de produtividade.

Dessa forma, a inoculação de bactérias diazotróficas em genótipos de cana-de-açúcar nas fases iniciais de seleção, quando existe maior variabilidade genética e em ambientes que favoreçam essa interação, pode levar à seleção de genótipos que sejam mais responsivos à inoculação, levando ao desenvolvimento de cultivares com maior potencial para a FBN.

Nesse sentido, esse trabalho teve como objetivo estudar os efeitos da inoculação de bactérias promotoras do crescimento vegetal e fixadoras de nitrogênio em famílias de cana-de-açúcar, na primeira fase de seleção de um programa de melhoramento genético. Também teve como objetivo avaliar a resposta de clones produtivos, selecionados a partir dessas famílias, submetidos a diferentes inoculantes a base de PGPB, na etapa seguinte de seleção. Dando subsídios ao melhoramento genético visando a FBN em cana-de-açúcar.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 A CULTURA NA CANA-DE-AÇÚCAR E SUA IMPORTÂNCIA ECONÔMICA

A cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) é uma monocotiledônea de grande importância econômica e social que possui uma capacidade única de acumular grandes quantidades de sacarose em seus colmos (BALDANI et al., 1997). A cadeia produtiva da cana-de-açúcar, seus produtos e subprodutos é uma relevante fonte de distribuição de riqueza (MATSUOKA et al., 2005). Além do álcool e do açúcar existem outros subprodutos originados dela, como o bagaço, diversos tipos de papéis, fármacos, levedura, ácido cítrico, ácido lático e glutamato monossódico e diferentes produtos provenientes da alcoolquímica como polietileno, éter, acetona entre outros (VIAN, 2009). Até seus resíduos, vinhaça e vinhoto, podem ser reutilizados como fertilizantes na própria cultura da cana-de-açúcar, com redução significativa do custo com fertilizantes e destinação final dos resíduos.

O Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar seguido pela Índia, China e Tailândia. Atualmente a cultura ocupa no país uma área de 8.527 mil hectares e uma produção de 596.629 mil toneladas, dados da última safra, 2012/2013 (CONAB, 2012). O país também é líder na produção de açúcar, sendo responsável por mais da metade do açúcar comercializado no mundo (MAPA, 2012), exportando para países como China, Rússia e Egito (USDA, 2012).

Entre os países produtores de cana-de-açúcar, o Brasil ainda possui uma das maiores produtividades médias (79,77 ton.<sup>-1</sup>), ficando abaixo apenas da Austrália (84,20 ton.<sup>-1</sup>) (USDA, 2010; CONAB, 2010). Isso mostra que a cultura ainda possui bons índices de produtividade, e capacidade de aumentá-la. Além disso, a cana-de-açúcar é considerada uma das melhores opções dentre as fontes de energia renováveis, com um futuro promissor no cenário mundial (MAULE, 2001).

Vale ressaltar que tanto o açúcar quanto o álcool não enfrentam grandes problemas com produtos substitutos. A cana-de-açúcar é reconhecidamente mais produtiva que a beterraba (também produtora de açúcar), que é altamente subsidiada. Os EUA vêm desenvolvendo tecnologia de produção de etanol a partir de milho, mas com eficiência aquém

da desejada, se comparada com a cana-de-açúcar (WAACK e NEVES, 1998; HOFFMANN, 2006). Por este motivo, é uma das poucas culturas atualmente com potencial para o aumento da produção, sem problemas na absorção de seus produtos pelo mercado, e com características agronômicas favoráveis ao seu cultivo em diferentes áreas, sem grandes comprometimentos na produtividade.

Estes dados apenas evidenciam a importância da cana-de-açúcar na economia brasileira, sendo atualmente a principal fonte de energia alternativa ao petróleo no país.

## 2.2 CENTRO DE ORIGEM DA CANA-DE-AÇÚCAR, CLASSIFICAÇÃO BOTÂNICA E CARACTERÍSTICAS

As variedades de cana-de-açúcar cultivadas são espécies e híbridos do gênero *Saccharum*, pertencem à família *Poaceae* e tribo *Andropogoneae*. O gênero *Saccharum* é caracterizado por um alto nível de ploidia e aneuploidia e é composto por seis espécies: *S. officinarum* L., *S. barberi* Jeswiet, *S. sinensi* Roxb. emend. Jeswiet, *S. spontaneum* L., *S. edule* Hassk. e *S. robustum* Brandes et Jeswiet ex Grassl (BLACKBURN, 1984; JANOO et al., 1999).

A espécie *S. officinarum* L. é originária do Pacífico Sul, provavelmente da Nova Guiné e é chamada de cana “nobre” devido ao alto teor de sacarose em seus colmos. As demais espécies tem seu centro de origem distribuído pela África, Índia e China (BLACKBURN, 1984).

Embora o exato centro de origem das espécies de cana-de-açúcar seja incerto, há o consenso de que ela seja originária do sudeste da Ásia (MIRANDA et al., 2008).

As cultivares de cana-de-açúcar atualmente usadas são híbridos interespecíficos de 6º a 10º geração, que têm em sua composição aproximadamente 80% de *S. officinarum* e o restante de *S. spontaneum* L.. A maior contribuição de *S. officinarum* se deve ao processo denominado “nobilização”, caracterizado pelo cruzamento entre *S. officinarum* e *S. spontaneum* L., seguida de dois retrocruzamentos tendo *S. officinarum* como pai recorrente. Os clones resultantes desta técnica de melhoramento apresentaram alta produtividade. Entretanto, esse processo aumentou de forma significativa a complexidade genética das cultivares (JANOO et al., 1999) resultando na ausência de alguns cromossomos e/ou em cromossomos duplicados (poli-aneuploidia). Por este motivo, considera-se que a cana-de-açúcar possua um dos genomas mais complexos existentes e considerado bem amplo (~3000

Mbp) (D'HONT et al., 1996; TOMKINS et al., 1999).

Essa característica genética confere a esta cultura certa adaptabilidade que permite seu cultivo em diferentes ambientes, tipos de solo e relevo, entretanto apresentando diferentes respostas a esses fatores (SANTOS, 2008).

## 2.3 A CULTURA DE CANA-DE-AÇÚCAR E A ADUBAÇÃO NITROGENADA

O nitrogênio é o elemento fertilizante mais caro dentre os macronutrientes, o que reflete principalmente os gastos com instalação de energia para obter os adubos nitrogenados (MALAVOLTA, 1981). Atualmente, estima-se que a demanda mundial de nutrientes fertilizantes seja de 169,68 milhões de toneladas, e que do total, 61% corresponde aos fertilizantes nitrogenados (FAO, 2004; FAO, 2010). Esse elemento pode ser utilizado na agricultura em diferentes formas sendo o sulfato de amônio, a uréia e o nitrato de amônio as principais.

Como o processo de produção desses fertilizantes necessita de alto consumo energético de combustíveis fósseis derivados de petróleo (ERENO, 2009), o preço dos adubos tem aumentado significativamente nos últimos anos. Esse acréscimo acaba acarretando em aumento do custo de produção uma vez que, na maioria dos países onde a cana-de-açúcar é cultivada, esse adubo é amplamente utilizado.

A cana-de-açúcar destaca-se por ter um hábito de crescimento ereto, que correlacionado a sua fisiologia (planta C4) fazem desta cultura uma espécie ideal no que se refere ao aproveitamento de radiação solar. Sua fisiologia lhe confere alta capacidade fotossintética e com elevado desenvolvimento e crescimento em regiões com temperaturas elevadas, resultando em um alto potencial na produção de biomassa (TAIZ e ZEIGER, 2002).

A cultura é propagada vegetativamente através de colmos e como produz uma grande quantidade de biomassa, demanda uma grande aplicação de nutrientes, principalmente nitrogênio (MATSUOKA et al., 2005). No Brasil, a cana-de-açúcar está dentre as culturas que mais utiliza adubos nitrogenados, consumindo cerca de 55 kg ha<sup>-1</sup>, perdendo em quantidade apenas para o K<sub>2</sub>O, 110 kg ha<sup>-1</sup> (FAO, 2004; FAO, 2010).

Para Poaceas como cana-de-açúcar, milho e sorgo, que são plantas de crescimento rápido, o nitrogênio é o mais necessário de todos os elementos requisitados (MOREIRA e SIQUEIRA, 2006), pois há mais átomos de nitrogênio na massa seca (três vezes mais) do que de qualquer outro elemento que se considere (MALAVOLTA, 1981). A deficiência de nitrogênio consiste, em muitos casos, no principal fator limitante do crescimento vegetal, uma

vez que este elemento está presente em diferentes moléculas como aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos, coenzimas e amidas essenciais ao desenvolvimento das plantas (TAIZ e ZEIGER, 2002).

Para Santos e Silva (2009), em seu trabalho analisando a melhor dose de nitrogênio em cana-soca, a dose recomendada foi a de 100 kg/ha, por apresentar alta produtividade e menor degradação ambiental, baseada nas perdas de N-lixiviado e N-volatilizado, dosagem esta também recomendada por Weber et al. (2001). Mas segundo Fuentes-Ramirez et al. (1999), na maioria dos países onde a cana-de-açúcar é cultivada, uma prática agrícola comum é a aplicação de 250 kg de nitrogênio por hectare ou mais, o que significa um alto custo para a sua produção. No entanto, calcula-se que em torno de 50% desse nitrogênio aplicado no solo seja perdido por diferentes processos como lixiviação, erosão, volatilização e desnitrificação (MOREIRA e SIQUEIRA, 2006).

O nitrogênio elementar é armazenado na biomassa (animal, planta, microrganismo) a partir de  $N_2$  da atmosfera,  $NH_4$  ou  $NO_3$ , sendo que uma porção dessa biomassa é constantemente transformada no reservatório de matéria orgânica morta, sendo parte do nitrogênio mineralizado e parte nela estabilizado. A quantidade de nitrogênio mineralizado é elevada, 2,5 vezes maior que a quantidade absorvida pelas plantas, e estima-se que desse nitrogênio apenas 40% seja absorvido, indicando grandes perdas por lixiviação ou emissão atmosférica. Devido a sua grande mobilidade, quando não é absorvido pela planta, a sua lixiviação pode promover a contaminação de córregos, rios e lagos, ou este elemento pode voltar para o ar em forma de amônia (ERENO, 2009).

A fixação biológica de nitrogênio é a principal via de adição de nitrogênio ao sistema solo-planta, contribuindo mais do que o dobro do que é aplicado via fertilizante mineral (MOREIRA e SIQUEIRA, 2006).

## 2.4 BACTÉRIAS PROMOTORAS DO CRESCIMENTO VEGETAL

Existem vários gêneros de microrganismos capazes de promover o desenvolvimento vegetal, sendo que a maior parte deles pertence aos reinos *Fungi* e *Bacteria* (SILVEIRA, 2008; MOREIRA e SIQUEIRA, 2006).

As bactérias promotoras de crescimento vegetal (*Plant Growth Promoting Bacteria* ou PGPB) são juntamente com os fungos arbusculares, os microrganismos mais conhecidos, sendo capazes de promover o desenvolvimento vegetal por meio de diferentes mecanismos

(SILVEIRA, 2008; MOREIRA e SIQUEIRA, 2006). Essas bactérias são capazes de fixar o nitrogênio da atmosfera, solubilizar fósforo, produzir sideróforos que sequestram e disponibilizam os íons férricos, oxidar o enxofre, produzir ácido hidrocianico (HCN) e outras substâncias (LUZ, 1996; RODRIGUEZ e FRAGA, 1999; TORTORA et al., 2010). Além disso, possuem a capacidade de produzir substâncias precursoras de reguladores vegetais, como produtos derivados de adenina (precursor na biossíntese de citoquinina) e compostos promotores de crescimento com atividade semelhante aos reguladores vegetais (SILVEIRA, 2008), sendo as principais classes, auxinas, citocininas, giberilinas, etileno e ácido abscísico (MOREIRA e SIQUEIRA, 2006).

Alguns autores dividem essas bactérias de acordo com as diferentes regiões da planta que elas colonizam (KLOEPPER et al., 1989; MARIN et al., 1999; GRAY e SMITH, 2005), sendo as rizobactérias (*Plant Growth Promoting Rhizobacteria* ou PGPR) as mais estudadas.

As rizobactérias são aquelas que habitam a rizosfera, ou seja, o solo especificamente influenciado pelas raízes das plantas. Essas bactérias vivem na rizosfera ou em associação com estruturas e substâncias produzidas pelas raízes das plantas, que podem servir como fonte de energia e nutrientes para essas bactérias. Em geral elas podem ser separadas em: rizobactérias extracelular, que vivem no solo próximo à raiz, no rizoplane, ou nos espaços intercelulares no córtex da raiz; e rizobactérias intracelulares, que vivem dentro das células das raízes, geralmente em estruturas especializadas, os nódulos (GRAY e SMITH, 2005).

As PGPR são isoladas com frequência de diversas espécies de plantas cultivadas, sendo os gêneros que mais se destacam *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Azospirillum* e *Rhizobium* (ARAUJO, 2008). Esses microrganismos podem causar efeitos morfológicos e fisiológicos diversos sobre as plantas, tais como: danificação dos tecidos radiculares, alteração no metabolismo, excreção de enzimas, toxinas e antibióticos e a acessibilidade e assimilação de nutrientes minerais (MOREIRA e SIQUEIRA, 2006).

A promoção do crescimento radicular é um dos marcadores pelo qual o efeito benéfico das bactérias promotoras de crescimento é medido. O estabelecimento rápido de raízes por alongamento de raízes primárias ou por proliferação de raízes laterais e adventícias é vantajoso para as plantas, pois essas têm sua habilidade de absorver nutrientes e água aumentada (SILVEIRA, 2008), devido à maior superfície de contato.

Entretanto outras espécies de bactérias, que vivem em outras partes da planta, também possuem a capacidade de promover o desenvolvimento vegetal e não se enquadram nessa classificação. Por este motivo também é utilizado o termo bactérias promotoras do crescimento vegetal ou PGPB, que abrange todos os tipos de bactérias que produzem efeitos

benéficos nas plantas, não estando necessariamente associadas às raízes e rizosfera. Estas bactérias podem ser utilizadas para tratamento de sementes, explantes e mudas micropropagadas, incorporadas ao substrato de plantio, tratamento de estacas, tubérculos e raízes, pulverizações na parte aérea incluindo folhagem e frutos, e em pós-colheita (MARIANO et al., 2004), possuindo efeitos similares àqueles observados nas rizobactérias.

#### 2.4.1 Bactérias Fixadoras de Nitrogênio

No Brasil, as descobertas realizadas por Döbereiner, a partir dos anos 40, sobre bactérias fixadoras nitrogênio em Poaceas trouxeram grandes avanços no estudo de microrganismos na agricultura. Foi a partir da descoberta dessas bactérias que outros microrganismos promotores de crescimento foram isolados. Entretanto, os estudos sobre a FBN permitiram muitos avanços, principalmente na cultura da soja.

Esses estudos fizeram com que essas bactérias fossem classificadas por alguns autores de uma forma diferenciada em relação às demais PGPB, embora também sejam PGPB. Segundo Marin et al. (1999) as bactérias fixadoras de nitrogênio podem ser simbióticas (no caso das leguminosas) ou associativas (no caso das Poaceas e outras famílias). Estas últimas estão divididas em bactérias de vida livre, endofíticas e endofíticas facultativas.

As bactérias endofíticas são definidas como microrganismos que colonizam os tecidos internos da planta, sem causar danos aparentes ao hospedeiro e sem produzir estruturas externas visíveis (AZEVEDO et al., 2002). De certa forma esse termo abrange as bactérias que vivem nos tecidos da raiz, porém também identifica aquelas que colonizam tecidos internos de outros órgãos vegetais como caule, folhas, etc. (MOREIRA e SIQUEIRA, 2006).

Para Oliveira et al. (2003a) bactérias endofíticas são organismos que se caracterizam pela associação íntima com a planta hospedeira, despertando grande interesse agrônomo. Além disso, o habitat endofítico possui características mais favoráveis à expressão de genes promotores de crescimento vegetal que a rizosfera, com alta disponibilidade energética e baixa competitividade com outras espécies. Entretanto, o fator mais importante a ser mencionado sobre as bactérias endofíticas é que no interior dos tecidos estão protegidas das altas concentrações de oxigênio que inibem a atividade da nitrogenase, aumentando a capacidade de fixar nitrogênio (MARIN et al., 1999). Dessa forma estas bactérias são mais eficientes em fixar nitrogênio em relação às demais.

Para Döbereiner (1997) essas bactérias nunca fixam nitrogênio mais do que as plantas



precisam, sendo que a disponibilidade de nitrogênio no solo inativa imediatamente a FBN, e as bactérias passam a utilizar o nitrogênio mineral em vez de fixar o da atmosfera. Na época em que Döbereiner escreveu esse trabalho o Brasil era o menor usuário de adubos nitrogenados no mundo, com uso em média de 20 kg ha<sup>-1</sup>, enquanto os países tropicais no Oriente, como a Índia, usavam dez vezes mais nitrogênio por hectare.

## 2.5 BACTÉRIAS PROMOTORAS DO CRESCIMENTO VEGETAL ASSOCIADAS À CANA-DE-AÇÚCAR

Os principais gêneros de bactérias que estão em associação com a cana-de-açúcar são *Azospirillum*, *Gluconacetobacter*, *Azotobacter*, *Beijerinckia*, *Herbaspirillum* e *Burkholderia*, e estas estão divididas entre endofíticas obrigatórias, endofíticas facultativas e bactérias de vida livre.

### 2.5.1 Bactérias endofíticas obrigatórias

Endofíticos são todos os microrganismos que são capazes de colonizar, durante uma parte do seu ciclo de vida, os tecidos internos das plantas, sem causar qualquer dano aparente para o hospedeiro. Porém as bactérias endofíticas obrigatórias em cana-de-açúcar sobrevivem por pouco tempo fora dos tecidos vegetais e por este motivo recebem essa classificação (BALDANI e BALDANI, 2005).

#### 2.5.1.1 *Gluconacetobacter diazotrophicus*

A espécie *G. diazotrophicus* foi primeiramente isolada do interior dos tecidos de plantas de cana-de-açúcar coletadas no Nordeste e Sudeste do Brasil e inicialmente denominada de *Saccharobacter nitrocaptans* (CAVALCANTE e DÖBEREINER 1988; BALDANI e BALDANI, 2005), sendo chamadas de *Acetobacter diazotrophicus* e reclassificadas posteriormente por Gillis et al. (1989) como *G. diazotrophicus*.

A pesquisa com essa bactéria começou a partir de estudos utilizando N<sup>15</sup>, onde foi observado que algumas variedades de cana-de-açúcar podiam obter até 60% do nitrogênio através da FBN. A princípio acreditava-se que essas bactérias eram encontradas apenas em

plantas de propagação vegetativa como cana-de-açúcar, batata doce e abacaxi. Posteriormente verificou-se a presença de bactérias desse gênero em plantas propagadas por semente como café e *Eleusine coracana* (capim-pé-de-galinha) (BALDANI e BALDANI, 2005).

Esta bactéria é capaz de infectar e colonizar os tecidos da raiz e parte aérea, penetrando pela ponta e lateral das raízes formadas durante o processo de enraizamento (JAMES et al., 1994). Possui a capacidade de crescer em pH ácido (3,0), inabilidade de usar nitrato como fonte de nitrogênio e fixar nitrogênio na presença de amônio em meio com alta concentração de açúcar (CAVALCANTE e DÖBEREINER 1988). Entretanto a eficiência na FBN é reduzida na presença de altas doses de adubos nitrogenados (FUENTES-RAMÍREZ et al., 1999).

Os efeitos na promoção do crescimento vegetal promovidos por *G. diazotrophicus* podem ser observados pelo aumento da massa fresca da parte aérea (aproximadamente 28%) em plantas de cana-de-açúcar (BALDANI et al., 1988) e aumento da estatura e diâmetro do colmo de plantas inoculadas (MUÑOZ-ROJA e CABALLERO-MELLADO, 2003). Também foi observado por Arencibia et al. (2006) resultados positivos na resistência induzida em cana-de-açúcar pela inoculação com *G. diazotrophicus* no controle de *Xanthomonas albilineans* (agente causal da escaldadura das folhas). Outros efeitos positivos foram observados quando esta bactéria foi utilizada na associação com outras espécies de bactérias no aumento de massa seca (OLIVEIRA et al., 2002) e no conteúdo de açúcar (PEREIRA, 2011), fazendo dessa bactéria uma das mais importantes na associação com cana-de-açúcar.

#### 2.5.1.2 *Herbaspirillum* spp.

A espécie *Herbaspirillum seropedicae* foi isolada das raízes de cereais quando procuravam identificar novos isolados de *A. brasilense*. Entretanto verificaram diferenças nas características de 119 isolados, sendo então encontrado um novo gênero, *Herbaspirillum*, e alguns isolados foram então classificados como *Herbaspirillum seropedicae*. Sua temperatura ideal de crescimento é próxima a 34°C, sendo capaz de reduzir nitrogênio atmosférico a amônia sob condições microaeróbicas e em uma ampla faixa de pH (5,3 a 8,0) (BALDANI et al., 1986).

O processo de colonização dessa bactéria começa por quimiotaxia de exudatos de raiz, seguido da entrada da bactéria, provavelmente através de aberturas nas regiões laterais das

raízes em crescimento, e colonização dos espaços intercelulares e tecidos vasculares de raízes e partes aéreas (JAMES et al., 2002; SILVA et al., 2003).

Baldani et al. (2000) verificaram aumento na massa fresca de plantas de arroz inoculadas com *H. seropedicae*, 30 dias após a semeadura (em meio de cultura) e aumento de massa seca e N total em experimento em casa de vegetação, 80 dias após a semeadura.

Canuto et al. (2003) obtiveram aumento de até 52,51% do teor de nitrogênio proveniente da FBN em plantas de cana-de-açúcar, quando inoculadas com diferentes estirpes de PGPB, sendo que os maiores valores foram observados naquelas inoculadas com *H. seropedica*. Os mesmos autores também verificaram aumento da massa seca de plantas de cana-de-açúcar inoculadas quando comparadas ao controle, não inoculado.

Efeitos positivos também foram observados quando esta bactéria foi utilizada em associação com outras espécies de bactérias, no aumento de massa seca em cana-de-açúcar (OLIVEIRA et al., 2002)

A espécie *Herbaspirillum rubrisubalbicans* é uma bactéria endofítica diazotrófica pertencente à classe  $\beta$  das proteobactérias e é capaz de se associar com várias Poaceas de interesse econômico como milho, arroz, sorgo, trigo e cana-de-açúcar (BALDANI et al., 1986). Este microrganismo pode ser isolado do interior de raízes, caule e folhas de cana-de-açúcar, porém não pode ser isolado do solo, sugerindo que ele estabelece uma interação endofítica, que pode ser não patogênica ou patogênica (BALDANI et al., 1986; OLIVARES et al., 1997).

Essa bactéria pode causar a doença da estria mosqueada na variedade B4362 de cana-de-açúcar e estrias vermelhas nas variedades de sorgo. Entretanto, não é verificado o sintoma em outras variedades de cana-de-açúcar, o que aumenta a evidência da especificidade da interação entre o genótipo e a estirpe (OLIVARES et al., 1997). Poucos trabalhos têm sido realizados utilizando apenas esta estirpe de bactéria na promoção do crescimento vegetal, no entanto, em associação com outras bactérias os efeitos no aumento de massa seca e conteúdo de nitrogênio foram relatados (OLIVEIRA et al., 2002; OLIVEIRA et al., 2003; OLIVEIRA et al., 2006; OLIVEIRA et al., 2009)

### 2.5.1.3 *Burkholderia* spp.

As *Burkholderias* estão presentes em um grande número de ambientes de importância ecológica. Muitas bactérias deste gênero foram isoladas dos solos e mostraram

uma relação simbiótica com a rizosfera das plantas atuando na solubilização do fósforo inorgânico (COENYE e VANDAME, 2003; PAYNE et al., 2006).

O gênero *Burkholderia* foi isolado de diferentes espécies de plantas, entretanto, apenas a espécie *Burkholderia vietnamiensis* era reconhecidamente diazotrófica (REIS et al., 2004). Análises de isolados de cana-de-açúcar mostraram a existência de uma outra espécie de *Burkholderia* colonizando esta planta, com o fenótipo bastante semelhante ao de *Herbaspirillum*. Após verificar diferenças nas características morfológicas de isolados de amostras de plantas de cana-de-açúcar, milho e estilosante, de diferentes regiões do Brasil, África do Sul e México, Reis et al. (2004) descreveram uma nova espécie denominada *Burkholderia tropica*.

Essa bactéria possui a capacidade de reduzir acetileno a etileno, tem a FBN inibida pela presença de nitrato, pela presença de amônia, por temperaturas acima de 36°C e abaixo de 25°C, sendo a temperatura ideal a de 30°C. O pH ideal está entre 5,0 e 5,8, porém cresce bem entre 4,5 a 6,5. O processo de infecção e colonização de arroz por estirpes de *Burkholderia* spp mostram que esta bactéria coloniza primeiro a superfície da raiz e depois entra através de espaços intercelulares (BALDANI, 1996; BALDANI e BALDANI, 2005).

Os efeitos na promoção do crescimento vegetal dessa espécie foram observados em plantas de arroz, onde houve aumento de massa seca da parte aérea e sementes, bem como na quantidade total de N em plantas inoculadas quando comparados ao controle (BALDANI et al., 2000). Na associação com outras espécies diazotróficas, observou-se o aumento da biomassa e conteúdo de N em plantas de cana-de-açúcar (OLIVEIRA et al., 2002).

## 2.5.2 Bactérias endofíticas facultativas

### 2.5.2.1 *Azospirillum* spp.

O gênero *Azospirillum* foi descrito pela primeira vez em 1976 por Döbereiner e Day (BASHAN e BASHAN, 2011) e atualmente compreendem as PGPR mais conhecidas e estudadas. A sua importância se deve, principalmente, à sua capacidade de se associar a uma ampla gama de espécies vegetais (BASHAN e BASHAN, 2011), incluindo algas (GONZALEZ e BASHAN, 2000) e também devido à sua utilidade que pode ser variada. Como exemplo, pode ser utilizado na produção de poly- $\beta$ -hydroxybutyrate (PHB) para uso medicinal e purificação de resíduos na água.

A espécie *Azospirillum brasilense* é considerada uma endofítica associativa facultativa (MARIN et al., 1999) e foi descrita pela primeira vez como *Spirillum lipoferum* (DÖBEREINER e DAY, 1976), sendo reclassificada como *A. brasilense* em 1978 (TARRAND et al., 1978) e desde então estudada por sua capacidade de fixar nitrogênio.

Em cana-de-açúcar, com a descoberta de bactérias endófitas como *G. diazotrophicus*, *H. seropedicae* (BALDANI et al., 1986) e *Burkholderia* spp. (YABUUCHI et al., 1992; BALDANI et al., 1997), os trabalhos passaram a focar nessas espécies devido à sua vantagem ecológica (PERIN et al., 2007) em relação às bactérias endofíticas facultativas e às de vida livre.

Embora a infecção no interior das raízes de Poaceas não seja uma característica generalizada da espécie *A. brasilense* e parecer restrita a algumas estirpes (BALDANI et al., 1986), Reis Junior (2000) verificou que esta bactéria pode ocorrer em tecidos de raízes, colmo e folhas de cana-de-açúcar. Tejera et al. (2005), isolando bactérias do solo e de diferentes tecidos de cana-de-açúcar não encontraram espécies do gênero *Gluconacetobacter*, apenas *A. brasilense*, sugerindo que esse resultado poderia ser devido ao efeito varietal, ambiental e as altas doses de nitrogênio ( $400\text{-}500\text{kg N ha}^{-1}\text{ ano}^{-1}$ ) aplicadas no local do experimento. Esses autores também confirmaram a capacidade dessas estirpes de *A. brasilense* em fixar nitrogênio, avaliando a atividade da nitrogenase e reforçando a importância dessa bactéria na cultura da cana-de-açúcar.

Além disso, têm-se atribuído outras vantagens provenientes da inoculação com *A. brasilense*, que não apenas a fixação biológica de N, uma vez que alguns estudos mostram que essa espécie fixa apenas o nitrogênio para seu próprio uso (MOUTIA et al., 2010). Vários outros efeitos benéficos têm sido atribuídos a estas bactérias (BASHAN e BASHAN, 2011) como a produção de reguladores vegetais (TIEN et al., 1979; MARTINEZ-MORALES et al., 2003), mudanças na morfologia de raízes como alongamento e aumento de pelos radiculares (HADAS e OKON, 1987), maior assimilação de nitrato (BODDEY e DÖBEREINER, 1988), solubilização de nutrientes (BASHAN e LEVANOBY, 1990; BASHAN e HOLGIN, 1997), maior absorção de água e micronutrientes (OKON, 1985; BASHAN et al., 1988) e Indução de Resistência Sistêmica (IRS) (TORTORA et al., 2010).

Os efeitos na promoção do crescimento vegetal promovidos por *A. brasilense* foram verificados em várias espécies e em inúmeros experimentos: em setária (COHEN et al., 1980); sorgo e painço (KAPULNIK et al., 1981); ervilha, ervilhaca e grão de bico (SARIG et al., 1986); tomate (HADAS e OKON, 1987; BASHAN et al., 1988) e tomate cereja (ROMERO et al., 2003); berinjela, pimenta e algodão (BASHAN et al., 1988); Cardón (*Pachycereus*

*pringlei*) (PUENTE e BASHAN 1992); milho (COHEN et al., 1980; MEHNAZ e LAZAROVITS, 2005); trigo (KAPULNIK et al., 1981; DIDONET et al., 2003; MEHNAZ e LAZAROVITS, 2005) e cana-de-açúcar (LOPES et al., 2012).

A espécie *Azospirillum amazonense* foi isolada das raízes de *Digitaria decumbens*, sendo diferenciada das demais espécies pela habilidade em usar sacarose como fonte de carbono, e por não suportar ambientes alcalinos (MAGALHÃES et al., 1983). Posteriormente, observou-se a presença dessa bactéria em grandes quantidades também em cana-de-açúcar (REIS JUNIOR et al., 2000).

A inoculação com essa espécie em arroz, em um experimento a campo, mostrou resultados positivos para massa seca das panículas e conteúdo total de N quando comparados ao controle (PEREIRA et al., 1988). Rodrigues et al. (2008) também verificaram aumento na massa seca dos grãos (7 a 11,6%), número de panículas (3 a 18,5%) e teor de nitrogênio acumulado na maturação dos grãos (3,5 a 18,5%) de arroz, inoculados com *A. amazonense*, além da contribuição de 27% na FBN por uma das estirpes estudadas. Entretanto, verificaram efeitos negativos da inoculação em condições gnotóbicas. Já Reis Junior et al. (2008), estudando o efeito da inoculação de *A. amazonense* em milho, também observaram aumento na produção de massa seca e conteúdo de nitrogênio. Porém, esse efeito foi observado apenas nas raízes e não na parte aérea.

### 2.5.3 Bactérias de vida livre

As bactérias diazotróficas de vida livre foram as primeiras a serem reconhecidas, como é o caso de *Beijerinckia fluminensis* e *Beijerinckia indica*, isoladas da rizosfera de cana-de-açúcar em solos tropicais. Elas colonizam preferencialmente o rizoplane e a rizosfera, onde exudatos são liberados pelas raízes das plantas, mostrando uma direta influência da planta no desenvolvimento dessas bactérias (MARIN et al., 1999; BALDANI e BALDANI, 2005).

Dentre as espécies de *Azotobacter* conhecidas, as mais comuns são *A. chroococcum*, *A. vinelandii* e *A. paspali*. Boddey et al. (1983) estudaram a eficiência dessa bactéria em fixar nitrogênio de forma biológica e verificaram um acúmulo de até 20 kg de N ha<sup>-1</sup> ano<sup>-1</sup> em *Paspalum notatum* cv. Batatais, promovido pela associação com *A. paspali*.

No entanto, a função atual dessas bactérias na associação com as Poaceas ainda não foi bem esclarecida e por isso requer mais estudos, um dos motivos pelos quais as mesmas são pouco utilizadas.

## 2.6 INOCULANTES

Inoculante é um produto formulado por microrganismos vivos, capazes de promover o crescimento vegetal de forma direta ou indireta, através de diferentes mecanismos sendo mundialmente denominados biofertilizantes. Geralmente inoculantes formulados com diferentes espécies, estirpes ou cepas de bactérias possuem melhor efeito quando comparados a inoculantes formulados por apenas uma espécie, estirpe ou cepa, devido ao efeito de sinergismo (GOVINDARAJAN et al., 2008).

No Brasil o inoculante mais conhecido é o da soja (REIS, 2007), responsável pela atual recomendação de ausência de suplementação com fertilizante nitrogenado, devido a sua alta eficiência (BOHRER e HUNGRIA, 1998). Porém, em Poacea a eficiência dos inoculantes compostos por bactérias associativas é bem menor quando comparado à simbiose, principalmente pela eficiência da enzima nitrogenase, que é afetada pela presença de oxigênio, que por sua vez tem sua concentração reduzida dentro do nódulo formado na simbiose soja-rizóbio.

Por este motivo, em Poacea, estudos avaliando a resposta de diferentes plantas à inoculação com PGPB são muitos, porém os resultados têm sido inconstantes na maior parte deles (MOREIRA et al., 2010). Um exemplo dos efeitos positivos pode ser observado no estudo de Okon e Labandera-Gonzales (1994), que analisando os efeitos da inoculação de *Azospirillum* em experimentos realizados ao longo de 20 anos de pesquisa, observaram que 60 a 70% apresentaram resultados significativos e aumentos de produção na ordem de 5 a 30%, de forma que atualmente inoculantes formulados por *Azospirillum* são comercializados.

Além disso, a eficiência da produção de inoculantes depende de vários fatores, como a manutenção do número mínimo de células viáveis da bactéria no inoculante (desde a sua fabricação até o uso pelo agricultor), competitividade das bactérias com outros microrganismos, sobrevivência após a inoculação (condições edafoclimáticas), bem como eficiência em diferentes solos e resposta aos genótipos vegetais (MOREIRA et al., 2010; FERREIRA et al., 2010).

Outro fator que apresenta grande importância no desempenho de um inoculante é a utilização de um veículo eficiente para a inoculação das bactérias diazotróficas, pois o veículo afeta diretamente a sobrevivência das bactérias antes e após a inoculação (FERREIRA et al., 2010). Até o momento os veículos mais utilizados para cana-de-açúcar são o turfoso e o

líquido, mas ambos apresentam vantagens e desvantagens. A principal vantagem do veículo turfoso é a manutenção da viabilidade das células bacterianas, ou seja, a sobrevivência das bactérias dentro da concentração ideal durante um longo período de tempo, o que é mais difícil em veículo líquido, em que a concentração da população está mais sujeita a variações. Por sua vez o inoculante líquido possui a vantagem de proporcionar maior facilidade na aplicação, via pulverização, o que não é possível com veículo turfoso, que é aplicado pela imersão dos toletes.

Estes fatores, associados à imprevisibilidade dos resultados, têm limitado o uso comercial de inoculantes formulados à base desses microrganismos no Brasil. Entretanto, recentemente para algumas Poaceas como milho, trigo e arroz, foram desenvolvidos alguns inoculantes a base de *A. brasilense*, bem como o desenvolvimento de um inoculante específico para cana-de-açúcar formado pela associação de cinco espécies de bactérias.

A espécie *A. brasilense* é uma das mais estudadas e que possui efeitos comprovados na promoção do desenvolvimento vegetal (BASHAN e BASHAN, 2011). Além disso, o *A. brasilense* é a bactéria modelo no estudo dos genes envolvidos na ação da nitrogenase (genes *nif*), e todas as rotas envolvidas na FBN em bactérias associativas (BALDANI e BALDANI, 2005). Para Mehnaz (2011) essa espécie é a escolha mais segura para a formulação de inoculantes, uma vez que não apresenta comportamento patogênico e tem demonstrado efeitos benéficos em vários estudos.

Já o inoculante específico para cana-de-açúcar, foi baseado em resultados obtidos em alguns trabalhos, em que foram avaliadas diferentes combinações de cinco espécies de bactérias diazotróficas isoladas da cana-de-açúcar (estirpes BR11281 de *G. diazotrophicus*, BR11335 de *H. seropedicae*, BR11504 de *H. rubrisubalbicans*, BR11145 de *A. amazonense* e BR11366 de *B. tropica*) (OLIVEIRA et al., 2002; OLIVEIRA et al., 2003; OLIVEIRA et al., 2006; OLIVEIRA et al., 2009). A vantagem deste inoculante seria o fato dessas bactérias terem sido isoladas de tecidos de cana-de-açúcar, e por serem endofíticas haveria mais eficiência na fixação biológica.

No entanto, a interação planta-bactéria ainda é um fator que influencia de forma significativa a eficiência dos inoculantes. Ou seja, o efeito do genótipo vegetal ainda precisa ser estudado com o objetivo de aumentar a eficiência dos inoculantes.

## 2.7 INTERAÇÃO PLANTA-BACTÉRIA



Estudos iniciais, objetivando quantificar a quantidade de N fixada de forma biológica por plantas de cana-de-açúcar, sugeriram que esta resposta era dependente da cultivar avaliada. A resposta diferenciada de cinco cultivares de cana-de-açúcar em relação à quantidade de N fixado mostrou que havia uma provável interação planta-bactéria, responsável por promover os diferentes resultados obtidos (LIMA et al., 1987).

Posteriormente, vários trabalhos desenvolvidos com cana-de-açúcar mostraram esse efeito do genótipo vegetal na resposta à inoculação com PGPB, levando a estudos mais aprofundados sobre esta associação.

Um bom exemplo dessa delicada interação na cana-de-açúcar é o da espécie *H. rubrisubalbicans*, uma das bactérias fixadoras de nitrogênio encontradas na cana-de-açúcar que, nas variedades suscetíveis, como a B4362, provoca a doença chamada de estria mosqueada (BALDANI et al., 1997)

Reis Júnior et al. (2000) quantificaram a presença de várias espécies e estirpes de bactérias endofíticas em quatro cultivares micropropagadas de cana-de-açúcar. Essas cultivares apresentavam respostas distintas à inoculação com bactérias diazotróficas. Não foi encontrada uma grande variação na população de bactérias entre as cultivares testadas, e os autores hipotetizaram que, a diferença de FBN nessas variedades, poderia ter sido devido a uma interação genótipo x microrganismo.

Muños-Rojas e Caballero-Mellado (2003) encontraram respostas diferentes na porcentagem de N fixado quando combinaram diferentes estirpes de *G. diazotrophicus* com as variedades MEX 57-473, MY 55-14 e CP 72-2086, atribuindo esta diferença à interação planta-bactéria. Os mesmos autores encontraram resultados positivos e negativos no crescimento vegetal, dependendo da estirpe de *G. diazotrophicus* usada e da cultivar de cana-de-açúcar, indicando que esta interação pode ser positiva ou negativa. Oliveira et al. (2006) compararam a inoculação com diferentes espécies de bactérias diazotróficas nas variedades de cana-de-açúcar SP70-1143 e SP81-3250, também encontrando grande influência do genótipo e do meio ambiente na resposta à inoculação com diferentes bactérias.

Atualmente sabe-se que a maior capacidade em fixar nitrogênio de forma biológica e promover o desenvolvimento vegetal está relacionada com vários fatores, e não só com a estirpe da bactéria, mas também com características varietais e ambientais (REIS JUNIOR et al., 2000). Alguns trabalhos sugerem que essa interação está relacionada com vários fatores: como a interferência de genótipos de cana-de-açúcar na atividade da nitrogenase (RUSCHEL e RUSCHEL, 1977); a incapacidade de plantas em liberar C na rizosfera (KENNEDY et al., 2004); diferenças nos exudatos liberados pelas raízes; nível endógeno e sensibilidade dos

tecidos vegetais à concentração de auxina (MOUTIA et al., 2010), bem como a capacidade das plantas em reabsorver os diferentes exudatos liberados (OLIVEIRA et al., 2003). Todos estes fatores podem ser citados como hipóteses para as diferenças encontradas na população de bactérias e capacidade da planta em responder à inoculação.

Entretanto, estudos mais avançados têm usado ferramentas moleculares para ajudar a compreender melhor os mecanismos envolvidos na interação. E genes expressos no processo de infecção e no reconhecimento das bactérias pelas plantas de cana-de-açúcar têm sido identificados.

Alguns possíveis genes envolvidos nessa interação foram identificados e estão relacionados com o reconhecimento de organismos patogênicos e não patogênicos, com a defesa das plantas aos patógenos e com o metabolismo do nitrogênio. No processo de reconhecimento foram identificados genes que atuam na produção de receptores de proteínas (*Receptor Like Kinase- RLKs*), como o gene *SHR5*. Na defesa foram identificados genes relacionados com o acúmulo de peróxido de hidrogênio e óxido nítrico, que por sua vez estão envolvidos no acúmulo de ácido salicílico e também na morte celular, em resposta à infecção (relacionados à defesa sistêmica adquirida - SAR); bem como vários genes que atuam na rota do etileno. Já no metabolismo do nitrogênio foram identificados genes que desempenham um importante papel na assimilação da amônia (gene *scGS1.b*) (NOGUEIRA et al., 2005; ARENCIBIA et al., 2006; VINAGRE et al., 2007; CARVALHO et al., 2011)

Como é possível observar, a maior parte desses genes estão relacionados ao processo de reconhecimento, infecção e defesa, ou seja, com o estabelecimento da bactéria nos tecidos da planta, havendo pouca relação com a eficiência na FBN e na promoção do crescimento, exceto aqueles envolvidos na rota do nitrogênio. Dessa forma, ainda são necessários estudos visando a resposta da cana-de-açúcar após a infecção, uma vez que a presença das PGPB nos tecidos da planta sempre é observado, entretanto os efeitos nem sempre são percebidos.

## 2.8 CULTIVARES DE CANA-DE-AÇÚCAR RESPONSIVAS A PGPB E O MELHORAMENTO GENÉTICO

A resposta diferenciada entre as cultivares de cana-de-açúcar à inoculação com PGPB já é bem conhecida. Além dos trabalhos de Baldani et al. (1997), Reis Júnior et al. (2000) e Muños-Rojas e Caballero-Mellado (2003) já citados, muitos outros foram desenvolvidos avaliando-se a capacidade de genótipos de cana-de-açúcar em responder a

PGPB. Boddey et al. (1995) verificaram que o genótipo não comercial Krakatau (*Saccharum spontaneum* L.) usado em programas de melhoramento e as variedades comerciais SP70-1143 e CB45-3 apresentaram grande quantidade de nitrogênio obtido através da FBN, podendo chegar a 72% (SP70-1143), enquanto o genótipo não comercial Chunees (*Saccharum barberi* Jeswiet) apresentou apenas 14% de nitrogênio proveniente da FBN. Coelho et al. (2003) avaliando as cultivares RB739735, SP79-2313, RB72454, RB758540, RB835089, RB825336, SP70-1143 e os genótipos Krakatau (*S. spontaneum* L.) e Chunees (*S. barberi* Jeswiet), observaram melhores resultados nas cultivares RB em relação às demais, atribuindo essa melhor resposta ao processo de melhoramento realizado em solos com baixa fertilidade natural de nitrogênio.

Já Xavier (2006) avaliando o acúmulo de nitrogênio de nove genótipos de cana-de-açúcar, durante oito anos de cultivo, sem aplicação de nitrogênio, verificou que as cultivares comerciais SP70-1143, SP71-6163, CB47-89, SP79-2312 e o genótipo Krakatau apresentaram altos valores de FBN, enquanto as cultivares CB45-3, SP71-1406, SP70-1284 e o genótipo Chunees apresentaram baixos valores de nitrogênio, resultados estes baseados no balanço total de nitrogênio.

O melhoramento genético para incremento da FBN não é um conceito novo. Já na década de 40, na Europa, foram desenvolvidos estudos com trevo (*Trifolium pratense*) e trevo subterrâneo (*Trifolium subterraneum*). Nas décadas de 60 e 70 os estudos foram desenvolvidos para avaliar a FBN nas culturas da fava (*Vicia faba*), soja (*Glycine max*), alfafa (*Medicago sativa*) e ervilha (*Pisum sativum*) (ALCANTARA et al., 2009). Porém em Poaceas, de forma geral e especificamente na cana-de-açúcar os estudos são poucos.

No Brasil, o exemplo de sucesso mais conhecido é o melhoramento genético da soja visando a FBN. Conforme já citado anteriormente, Hungria et al., (1994) mencionam que graças ao programa de seleção e melhoramento da soja no Brasil, que levou em consideração a capacidade da planta fixar nitrogênio, é possível uma economia de cerca de 1 bilhão de dólares por ano ao país (valores estes obtidos no ano do estudo), devido à inoculação da soja com bactérias fixadoras de nitrogênio do gênero *Bradyrhizobium*. Isso permitiu que a soja fosse cultivada apenas com o uso de inoculante, sem a suplementação com fertilizante nitrogenado.

Como se pode verificar, a maior parte dos trabalhos está focada na avaliação de cultivares comerciais quanto à resposta a inoculação PGPB. Já em 1976, em um congresso internacional sobre o uso da engenharia genética em experimentos de FBN no campo, onde vários aspectos da interação planta-bactéria visando o incremento da FBN na associação

foram discutidos, Döbereiner mencionou que era necessário não focar apenas em estudos de estirpes de bactérias e linhagens mais eficientes, mas sim que a melhor estratégia era focar nos programas de melhoramento genético (BALDANI e BALDANI, 2005). Entretanto, desde então poucos tem sido os trabalhos de melhoramento visando melhor resposta a FBN a as PGPB em Poaceas, principalmente em cana-de-açúcar.

A seleção em cana-de-açúcar visa à obtenção de genótipos altamente produtivos, resistentes a doenças e com boa adaptabilidade a diferentes ambientes. Este é um longo e caro processo que consiste em um número determinado de etapas, sendo que esse número depende do programa de melhoramento. Em cada etapa são realizadas avaliações que permitem a identificação dos clones promissores, que passarão para a fase seguinte, sendo que apenas uma pequena porcentagem chega até as etapas finais e apenas alguns clones acabam tornando-se cultivares comerciais. Geralmente, o tempo gasto entre a realização do cruzamento e a liberação comercial das variedades varia de acordo com o programa de melhoramento genético, podendo ser de 12 anos a 15 anos (LANDELL et al., 1999; KIMBENG e COX, 2003).

A busca de genótipos mais responsivos à inoculação com bactérias diazotróficas não está entre os objetivos desses programas de melhoramento. Apesar disso, a seleção indireta para genótipos com maior capacidade de interação pode estar ocorrendo quando a seleção é feita em ambientes menos favoráveis, principalmente em solos com baixa quantidade de nitrogênio.

### 3. REFERÊNCIAS

ALCANTARA, R. M. C. M.; ROCHA, M. M.; XAVIER, G. R.; RUMJANEK, N. G. 2009 Estado atual da arte quanto à seleção e o melhoramento de genótipos para a otimização da FBN. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Embrapa Meio-Norte, Documento 196, 31p, 2009.

ARAÚJO, F. F. 2008 Inoculação de sementes com *Bacillus subtilis*, formulado com farinha de ostras e desenvolvimento de milho, soja e algodão, Ciência Agrotecnologia, Lavras, v. 32, n. 2, p. 456-462.

ARENCIBIA, A. D.; VINAGRE, F.; ESTEVEZ, Y.; BERNAL, A.; PEREZ, J.; CAVALCANTI, J. SANTANA, I.; HEMERLY, A. S. 2006 *Gluconacetobacter diazotrophicus* elicits a sugarcane defense response against a pathogenic bacteria *Xanthomonas albilineans*. Plant Signaling & Behavior, v.1, p.265-273.

AZEVEDO, J. L.; MACCHERONI JR., W.; PEREIRA, J. O. ARAÚJO, W. L. 2000 Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. Electronic Journal of Biotechnology, v.3, p. 41-65.

BALDANI, J. I.; POT, B.; KIRCHHOF, G.; FALSEN, E.; BALDANI, V. L.; OLIVARES, F. L.; HOSTE, B.; KERSTERS, K.; HARTMANN, A.; GILLIS, M.; DÖBEREINER, J. 1996 Emended description of *Herbaspirillum*; a mild plant pathogen, as *Herbaspirillum rubrisubalbicans* comb. nov.; and classification of a group of clinical isolates (EF group 1) as *Herbaspirillum* species. International Journal of Systematic Bacteriology, v.46, p.802–810.

BALDANI, J. I.; BALDANI, V. L. D.; SELDIN, L.; DÖBEREINER, J. 1986 Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* gen. nov., sp. nov., a root-associated nitrogen-fixing bacterium. International Journal of Systematic Bacteriology, v.36, p.86–93.

BALDANI, I. J.; BALDANI, L.V. 2005 History on the biological nitrogen fixation research in graminaceous plants: special emphasis on the Brazilian experience. Anais da Academia Brasileira de Ciências, 77:549-579. PMID:16127558.

BALDANI, J. L. BALDANI, V. L. D. 2005 History on the biological nitrogen fixation research in graminaceous plants: special emphasis on the Brazilian experience. Anais da Academia Brasileira de Ciências, v. 77 p. 549-579.

BALDANI, J. I.; AZEVEDO, M. S.; REIS, V. M.; TEIXEIRA, K. R. S.; OLIVARES, F. L.; GOI, S. R.; BALDANI, V. L. D.; DÖBEREINER, J. 1999 Fixação biológica de nitrogênio em gramíneas: avanços e aplicações. In: SIQUEIRA, J. O.; MOREIRA, F. M. S.; LOPES, A. S.; GHILHERME, L. R. G.; FAQUIN, V.; FURTINI NETO, A. E.; CARVALHO, J. G., Inter-relação fertilidade, biologia do solo e nutrição de plantas. Viçosa, SBCS/UFLA, p. 621–666.

BALDANI, J. I.; CARUSO, L.; BALDANI, V. L. D.; GOI, S. R.; DÖBEREINER, J. 1997 Recent advances in BNF with nonlegume plants. *Soil Biology and Biochemistry*, v. 29, p.911-22.

BALDANI, V. L. D.; DOBEREINER, J.; BALDANI, J. I. 2000 Inoculation of rice plants with the endophytic diazotrophs *Herbaspirillum seropedicae* and *Burkholderia* spp.. *Biology and Fertility of Soils*, v.30, p.485–491.

BALDANI, V. L. D.; DE ALVAREZ, M. A. B.; BALDANI, J. I.; DÖBEREINER J. 1986 Establishment of inoculated *Azospirillum* spp in the rhizosphere and in roots of field grown wheat and sorghum. *Plant and Soil*, v.90, p. 35–46.

BASHAN, Y, REAN, Y. LEVANONY, H. SADE, A. 1988 Nonspecific responses in plant growth, yield, and root colonization of noncereal crop plants to inoculation with *Azospirillum brasilense* Cd. *Canadian Journal of Botany*, v. 67, p. 1317-1324.

BASHAN, Y.; HOLGUIN, G., 1997 *Azospirillum* plant relationships: environmental and physiological advances (1990-1996). *Canadian Journal of Microbiology*, 43:103-121.

BASHAN, Y.; LEVANONY, H., 1990 Current status of *Azospirillum* inoculation technology: *Azospirillum* as a challenge for agriculture. *Canadian Journal of Microbiology*, v.36, p.591-608.

BASHAN, Y.; BASHAN, L. E., 2011 How the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum* promotes plant growth: A critical assessment. *Advances in Agronomy*, 108: 77-136. DOI: 10.1016/S0065-2113.

BASHAN, Y.; REAM, Y.; LEVANONY, H.; SADE, A. 1988 Nonspecific responses in plant growth, yield, and root colonization of noncereal crop plants to inoculation with *Azospirillum brasilense* Cd. *Canadian Journal of Botany*, v.67, p. 1317-1324.

BLACKBURN, F. 1984 Sugar-cane. 1º Edição, Longman, London and New York (Tropical Agriculture Series), 414 p.

BOHRER, T. R. J.; HUNGRIA, M. 1998 Avaliação de cultivares de soja quanto à fixação biológica do nitrogênio. Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília, v.33, n.6, p.937-952.

BODDEY, R. M.; DÖBEREINER, J. 1988 Nitrogen fixation associated with grasses and cereals: recent results and perspectives for future research. Plant and Soil, v.108, p.53-65.

BODDEY, R. M.; OLIVEIRA, O. C.; URQUIAGA, S.; REIS, V. M.; OLIVARES, E. L.; BALDANI, V. L. D.; DOBEREINER, J. 1995 Biological nitrogen fixation associated with sugar cane and rice contributions and prospects for improvement. Plant and Soil, v.174, p.195-209.

CALIJA, V.; HIGGINS, A. J.; JACKSON, P. A.; BIELING, L. M.; COOMANS, D. 2001 An operations research approaches to the problem o the sugarcane selection. Annals of Operations Research: Netherlands, v.108, p.123-142.

CANUTO, E. L.; OLIVEIRA, A. L. M.; REIS, V. M.; BALDANI, J. I. 2003 Avaliação da contribuição da fixação biológica de nitrogênio em cana-de-açúcar originada de sementes e inoculada com endófitos fixadores de nitrogênio. Brazilian Journal of Microbiology, v.34, p.62-64.

CARVALHO, T. L. G.; FERREIRA, P. C. G.; HEMERLY, A. S. 2011 Sugarcane Genetic Controls Involved in the Association with Beneficial Endophytic Nitrogen Fixing Bacteria. Tropical Plant Biology. v.4, p. 31–41.

CAVALCANTE, V. A.; DOBEREINER, J. 1988 A new acid-tolerant nitrogen-fixing bacterium associated with sugarcane. Plant and Soil, v.1, n. 23-31.

COELHO, C. H. M.; MEDEIROS, A. F. A.; POLIDORO, J. C.; XAVIER, R. P.; RESENDE, A.; QUESADA, D. M.; ALVES, B. J. R.; BODDEY, R.; URQUIAGA, S., 2003 Identification of genotypes of sugar cane with respect to their potential contribution from biological nitrogen fixation. Agronomia, v.37, p.37–40.

COENYE, T.; VANDAMME, P. 2003 Diversity and significance of *Burkholderia* species occupying diverse ecological niches. Environmental Microbiolology, v.5, p.719-729.

COHEN, E.; OKON, Y.; KIGEL, J.; NUR, I.; HENIS, Y. 1980 Increase in dry weight and total nitrogen content in *Zea mays* and *Setaria italica* associated with nitrogen-fixing *Azospirillum* spp.. Plant Physiology, v.66, p.746-749.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO (CONAB) Acompanhamento da safra brasileira de cana-de-açúcar. Disponível em: <[http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/12\\_12\\_12\\_10\\_34\\_43\\_boletim\\_cana\\_portugues\\_12\\_2012.pdf](http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/12_12_12_10_34_43_boletim_cana_portugues_12_2012.pdf)>. Acesso em dezembro de 2012.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO (CONAB). Boletim da Safra 2010 de cana-de-açúcar. Disponível em <<http://www.conab.gov.br/conteudos.php?a=1028&t=2>> Acesso em outubro de 2010.

D'HONT, A.; GRIVET, L.; FELDMANN, P.; RAO, S.; BERDING, N.; GLASZMANN, J. C. 1996 Characterization of the double genome structure of modern sugarcane cultivars (*Saccharum* spp.) by molecular cytogenetic. *Molecular Genetics and Genomics*, v.250, p.405–413.

DIDONET, A. D.; RODRIGUES, O. 2002 Effect of inoculation of wheat seeds with *Azospirillum brasilense* (245) and *Azospirillum lipoferum* in field trials. *Current Plant Science and Biotechnology in Agriculture*, v.38, p. 428.

DÖBEREINER, J. 1997 A importância da fixação biológica de nitrogênio para a agricultura sustentável. *Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*, v.1, n.1, 2p. Disponível em [http://www.biotecnologia.com.br/revista/bio01/1hp\\_15.pdf](http://www.biotecnologia.com.br/revista/bio01/1hp_15.pdf). Acesso em outubro de 2012.

DÖBEREINER, J.; DAY, J. M. 1976 Associative symbiosis in tropical grass: Characterization of microorganisms and dinitrogen-fixing sites. *Proceedings of the International Symposium on N<sub>2</sub> Fixation*, Sep. 13-17, 1976, Washington State University, p. 518-537.

ERENO, D. 2008 Adubo biológico - Bactérias substituem fertilizantes nitrogenados como promotores de crescimento da cana-de-açúcar. *Pesquisa FAPESP*, Edição Impressa n.148.

FERREIRA, J. S.; BALDANI, J. I.; BALDANI, V. L. D. 2010 Seleção de inoculantes à base de turfa contendo bactérias diazotróficas em duas variedades de arroz. *Acta Scientiarum Agronomy*, v. 32, p. 179-185.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO) 2004 Fertilizer use by crop in Brazil. FAO, Roma, 53p.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO) 2010 World fertilizer trends and Outlook to 2014. FAO, Roma, 40 p.



FUENTES-RAMIREZ, L. E.; CABALLERO-MELLADO, J.; SEPÚLVEDA, J.; MARTINEZ-ROMERO, E. 1999 Colonization of sugarcane by *Acetobacter diazotrophicus* is inhibited by high N-fertilization. *FEMS Microbiology Ecology*, v.29, p.117-128.

GILLIS, M.; KERSTERS, K.; HOSTE, B.; JANSSENS, D.; KROPPESTEDT, R. M.; STEPHAN, M. P.; TEIXEIRA, K. R. S.; DOBEREINER, J.; LEY, J. 1989 *Acetobacter diazotrophicus* sp. nov., a nitrogen-fixing acetic acid bacterium associated with sugarcane. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 39:361-364.

GONZALEZ, L. E.; BASHAN, Y., . 2000 Increased growth of the microalga *Chlorella vulgaris* when coimmobilized and cocultured in alginate beads with the plant-growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense*. *Applied And Environmental Microbiology*, v.66, p. 1527–1531.

GOVINDARAJAN, M.; BALANDREAU, J.; MUTHUKUMARASAMY, R.; KWON, S.W.; WEON, H.Y.; LAKSHMINARASIMHAN, C. 2008 Effects of the inoculation of *Burkholderia vietnamiensis* and related endophytic diazotrophic bacteria on grain yield of rice. *Microbial Ecology*, v.55, p.21–37.

GRAY, E. J.; SMITH, D. L. 2005 Intracellular and extracellular PGPR: commonalities and distinctions in the plant–bacterium signaling processes. *Soil Biology and Biochemistry*, v.37, p.395-412.

HADAS, R.; OKON, Y. 1987 Effect of *Azospirillum brasilense* inoculation on root morphology and respiration in tomato seedlings. *Biology and Fertility of Soil*, v.5, p.241-247.

HOFFMANN, R. 2006 Segurança alimentar e produção de etanol no Brasil. *Segurança Alimentar e Nutricional*, v.13, p.01-05.

HUNGRIA, M.; VARGAS, M. A. T.; SUHET, A. R.; PERES, J. R. R. 1994 Fixação biológica do nitrogênio na soja. In: ARAUJO, R. S.; HUNGRIA, M. (Eds.). *Microorganismos de importância agrícola*. Embrapa-SPI, p.9-89.

PAYNE, G. W.; RAMETTE, A.; ROSE, H. L.; WEIGHTMAN, A. J.; JONES, T. H.; TIEDJE, J. M.; MAHENTHIRALINGAM, E. 2006 Application of a recA gene-based identification approach to the maize rhizosphere reveals novel diversity in *Burkholderia* species. *FEMS Microbiology Letters*, v. 259, p.126-132.

JAMES, E. K.; GYANESHWAR, P.; MATHAN, N.; BARRAQUIO, W. L.; REDDY, P. M.; IANNETTA, P. P. M.; OLIVARES, F. L.; LADHA, J. K. 2002 Infection and Colonization of

Rice Seedlings by the Plant Growth Promoting Bacterium *Herbaspirillum seropedicae* Z67. Molecular Plant-Microbe Interactions. v. 15, p. 894-906.

JAMES, E. K.; REIS, V. M.; OLIVARES, F. L.; BALDANI, J. I.; DÖBEREINER, J. 1994 Infection of sugarcane by the nitrogen-fixing bacterium *Acetobacter diazotrophicus*. Journal of Experimental Botany, v. 45, p.757–766.

JANNOO, N, GRIVET, L., DOOKUN, A. D'HONT, A., GLASZMANN, J. C. 1999 Evaluation of the genetic base of sugarcane cultivars and structuration of the diversity at the chromosome level using molecular markers. Food and Agricultural Research Council, Réduit, Mauritius, p.123-135. Disponível em <http://encountermauritius.gov.mu/portal/sites/ncb/moa/farc/amas99/s41.pdf> Acesso em dezembro de 2012.

JANNOO, N.; GRIVET, L.; SEGUIN, M.; PAULET, F.; DOMAINGUE, R.; RAO, P. S.; DOOKUN, A.; D'HONT, A.; GLASZMANN, J. C. 2004 Molecular investigation of the genetic base of sugarcane cultivars. Theoretical and Applied Genetics (TAG), Berlin, v.99, n.1-2, p.171-184.

LOPES V. R.; BESPALHOK FILHO, J. C.; ARAUJO, L. M.; RODRIGUES, F. V.; DAROS, E.; OLIVEIRA, R. A. 2012 The selection of sugarcane families that display better associations with plant growth promoting rhizobacteria. Journal of Agronomy, v: 11, p. 43-52. DOI: 10.3923/ja.2012.43.52

KLOEPPER, J. W.; LIFSHITZ, K.; ZABLOTOWICZ, R. M. 1989 Free-living bacterial inocula for enhancing crop productivity. Trends in Biotechnology, v.7, p.39–43.

KAPULNIK, Y.; KIGEL, J.; OKON, Y.; NUR, I.; HENIS, Y. 1981 Effect of *Azospirillum* inoculation on some growth parameters and N-content of wheat, sorghum and panicum. Plant and Soil, v.61, p. 65-70.

KENNEDY, A. C., 1999 Bacterial diversity in agroecosystems. Agriculture, Ecosystems & Environment, 74: 65-76.

KENNEDY, I. R. CHOUDHURY, A. T. M. A. KECSKÉS, M. L. 2004 Non-symbiotic bacterial diazotrophs in crop-farming systems: can their potential for plant growth promotion be better exploited? Soil Biology & Biochemistry, v.36, p.1229–1244.

KIMBENG, C. A.; COX, M. C. 2003 Early generation selection of sugarcane families and clones in Australia: a review. Journal American Society of Sugarcane Technologists, [S.I], v.23, p.20-39.

LADHA, J. K.; TIROL-PADRE, A.; PUNZALAN, G. C.; WATANABE, I. 1987 Nitrogen-fixing ( $C_2H_2$ -reducing) activity and plant growth characters of 16 wetland rice varieties. *Soil Science and Plant Nutrition*, v. 33, p. 187-200.

LANDELL, M. G. DE A.; ALVAREZ, R.; ZIMBACK, L.; CAMPANA, M. P.; SILVA, M. DE A.; VILA NOVA, J. C.; PEREIRA, A.; PERECIN, D.; GALLO, P. B.; MARTINS, A. L. M.; KANTHACK, R. A. D.; FIGUEIREDO, P.; VASCONCELOS, A. C. M. 1999 Avaliação final de clones IAC de cana-de-açúcar da serie 1982, em Latossolo Roxo da região de Ribeirão Preto. *Bragantia*, Campinas, v.58, p.269-280.

LIMA, E.; BODDEY, R. M.; DÖBEREINER, J. 1987 Quantification of biological nitrogen fixation associated with sugarcane using a  $^{15}N$  aided nitrogen balance. *Soil Biology & Biochemistry*, v.19, p.165-170.

LOPES, A. A. C.; REIS JUNIOR, F. B.; MENDES, I. C.; ALVES, G. C.; MARRIEL, I. E.; REIS, V. M. Efeito da inoculação com *Herbaspirillum seropedicae* sobre a produtividade do milho nos períodos de safra e safrinha. IX Simpósio Nacional Cerrados e II Simpósio Internacional das Savanas Tropicais, 2008 Disponível em <[http://simposio.cpac.embrapa.br/simposio%20em%20pc210%20\(Pc210\)/trabalhos\\_pdf/00684\\_trab1\\_ap.pdf](http://simposio.cpac.embrapa.br/simposio%20em%20pc210%20(Pc210)/trabalhos_pdf/00684_trab1_ap.pdf)>. Acesso em 20/12/2009.

LUZ, W. C. 1996 Rizobactérias promotoras de crescimento de plantas e de bioproteção. *Revisão Anual de Patologia de Plantas*, v.4, p.1-50.

MAGALHAES, F. M.; BALDANI, J. I.; SOUTO, S. M.; KUYKENDALL, J. R.; DOEBEREINER, J. 1983 A new acid-tolerant *Azospirillum* species. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*. Rio de Janeiro, v. 55, n. 4, pp. 417-430.

MALAVOLTA, E. 1981 Manual de química agrícola: adubos e adubação. 3º Ed. São Paulo, Agronômica Ceres, 596p.

MARIANO, R. L. R.; SILVEIRA, E. B.; ASSIS, S. M. P.; GOMES, A. M. A.; NASCIMENTO, A. R. P.; DONATO, V. M. T. S. 2004 Importância de bactérias promotoras de crescimento e de biocontrole de doenças de plantas para uma agricultura sustentável. *Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agronômica*, Recife, v. 1, p. 89-111.

MARIN, V. A.; BALDANI, V. L.; TEIXEIRA, K. R. S.; BALDANI, J. I. 1999 Fixação biológica de nitrogênio: bactérias fixadoras de nitrogênio e sua importância para a agricultura tropical. Disponível em <[http://www.cnpab.embrapa.br/publicacoes/fbn\\_ao\\_leg.html](http://www.cnpab.embrapa.br/publicacoes/fbn_ao_leg.html)>. Acesso em novembro de 2010.

MARTINEZ-MORALES, L. J. SOTO-URZUA, L. BACA, B. E.; SANCHES, J. A. 2003 Indole-3-butyric acid (IBA) production in culture medium by wild strain *Azospirillum brasilense*. Federation of European Microbiological Societies Letters, v.228, p. 167-173.

MATSUOKA, S.; GARCIA, A. A. F.; ARIZONO, H. 2005 Melhoria da cana-de-açúcar. In: BOREM, A. Melhoria de espécies cultivadas. Viçosa: Editora UFV, p.205-251.  
MAULE, R.F., MAZZA, J.A.; MARTA JR., G.B. 2001 Produtividade agrícola de cultivares de cana-de-açúcar em diferentes solos e épocas de colheita. Scientia Agrícola, v.58, p.295-301, 2001.

MEHNAZ, S. Plant Growth-Promoting Bacteria Associated with Sugarcane, p.165-182 In: Maheshwari, D. K. 2011 Bacteria in Agrobiolgy: Crop Ecosystems, Springer Heidelberg Dordrecht London New York, 448p.

MEHNAZ, S.; LAZAROVITS, G. 2006 Inoculation effects of *Pseudomonas putida*, *Gluconacetobacter azotocaptans*, and *Azospirillum lipoferum* on corn plant growth under greenhouse conditions. Microbial Ecology, v. 51, p.326–335.

MENDONÇA, M. M.; URQUIAGA, S. S.; REIS V. M. 2006 Variabilidade genotípica de milho para acumulação de nitrogênio e contribuição da fixação biológica de nitrogênio. Pesquisa Agropecuária Brasileira, v.41, p.1681-1685.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO (MAPA) Cana-de-açúcar. Disponível em <<http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/cana-de-acucar>>. Acesso em dezembro 2012.

MIRANDA, L. L. D.; VASCONCELOS, A. C. M.; LANDELL, M. G. 2008 Cana-de-açúcar, Instituto Agrônomo de Campinas, Campinas, 882p.

MOREIRA, F. M. S.; SILVA, K.; NÓBREGA, R. S. A.; CARVALHO, F. 2010 Bactérias diazotróficas associativas: diversidade, ecologia e potencial de aplicações. Comunicata Scientiae v.2, p.74-99.

MOUTIA, J. F. Y., SAUMTALLY, S., SPAEPEN, S., VANDERLEYDEN, J., 2010 Plant growth promotion by *Azospirillum* sp. in sugarcane is influenced by genotype and drought stress. Plant and Soil, v.337, p.233–242. DOI: 10.1007/s11104-010-0519-7.

MUÑOS-ROJAS, J. CABALLERO-MELLADO, J. 2003 Population dynamics of *Gluconacetobacter diazotrophicus* in sugarcane cultivars and effect on plant grow. Microbial

Ecology, v.45, p.454-464.

NOGUEIRA, E. DE M.; VINAGRE, F.; MASUDA, H. P.; VARGAS, C.; PÁDUA, V. L. M.; SILVA, F. R.; SANTOS, R. V.; BALDANI, J. I.; CAVALCANTI, P.; FERREIRA, G.; HEMERLY, A. S. 2001 Expression of sugarcane genes induced by inoculation with *Gluconacetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum rubrisubalbicans*. Genetics and Molecular Biology, v.24, p.199-206.

NOGUEIRA, E. DE M.; OLIVARES, F. L.; JAPIASSU, J. C.; VILAR, C.; VINAGRE, F.; BALDANI, J. I.; HEMERLY, A. S., 2005 Characterization of glutamine synthetase genes in sugarcane genotypes with different rates of biological nitrogen fixation. Plant Science, v.169, p. 819–832.

OKON, Y. 1985 *Azospirillum* as a potential inoculant for agriculture. Trends in Biotechnology, v.3, p.223-228.

OKON, Y., LABANDERA-GONZALES, C. A. 1994 Agronomic applications of *Azospirillum*: an evaluation of 20 years of world-wide field inoculation. Soil Biology and Biochemistry 26:1591-1601.

OLIVARES, F. L.; JAMES, E. K.; BALDANI, J. I.; DOBEREINER, J., 1997 Infection of mottled stripe disease-susceptible and resistant sugar cane varieties by the endophytic diazotrophic *Herbaspirillum*. New Phytologist, v.135, p.723-737. DOI: 10.1046/j.1469-8137.1997.00684.x.

OLIVEIRA, A. L. M.; CANUTO, E. L.; URQUIAGA, S.; REIS, V. M.; BALDANI, J. I. 2003 Response of micropropagated sugarcane varieties to inoculation with endophytic diazotrophic bacteria. Brazilian Journal of Microbiology, v. 34, p.59-61. ISSN 1517-8382

OLIVEIRA, A. L. M.; CANUTO, E. L.; URQUIAGA, S.; REIS, V. M.; BALDANI, J. I. 2006 Yield of micropropagated sugarcane varieties in different soil types following inoculation with diazotrophic bacteria. Plant and Soil, v.284 p.23–32. DOI 10.1007/s11104-006-0025-0

OLIVEIRA, A. L. M.; STOFFELS, M.; SCHMID, M.; REIS, V. M.; BALDANI, J. I. HARTMANN, A. 2009 Colonization of sugarcane plantlets by mixed inoculations with diazotrophic bacteria. European Journal of Soil Biology, v.45, p.106 – 113.

OLIVEIRA, A. L. M.; URQUIAGA, S.; BALDANI, J. I. 2003a Processos e mecanismos envolvidos na influencia de microrganismos sobre o crescimento vegetal. Embrapa Agrobiologia. Disponível em

<<http://www.cnpab.embrapa.br/publicacoes/download/doc161.pdf>>. Acesso em novembro de 2010.

OLIVEIRA, A. L. M.; URQUIAGA, S.; DÖBEREINER, J.; BALDANI, J. I. 2002 The effect of inoculating endophytic N<sub>2</sub>-fixing bacteria on micropropagated sugarcane plants. *Plant and Soil*, v.242, p.205–215.

PEREIRA, J. A. R.; CAVALCANTE, V. A.; BALDANI, J. I.; DOBEREINER, J. 1988 Field inoculation of sorghum and rice with *Azospirillum* spp. and *Herbaspirillum seropedicae*. *Plant and Soil*, v.110, p.269-274.

PEREIRA, W., 2011 Produtividade e qualidade tecnológica da cana-de-açúcar inoculada com bactérias diazotróficas. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Curso de Pós-Graduação em Agronomia. 70p.

PERIN, L.; ARAÚJO, J. L. M.; REIS, V. M. 2007 Aspectos genéticos e moleculares na interação entre organismos patogênicos e diazotróficos em cana-de-açúcar. Embrapa Agrobiologia. Disponível em <[www.cnpab.embrapa.br/publicacoes/download/doc233.pdf](http://www.cnpab.embrapa.br/publicacoes/download/doc233.pdf)>. Acesso em novembro de 2010.

PUENTE, M-E.; BASHAN, Y. 1992 Effect of Inoculation with *Azospirillum brasilense* strains on the germination and seedlings growth of the giant columnar Cardon cactus (*Pachycereus pringlei*). *Symbiosis*, v.15, p.49-60.

REIS JUNIOR F. B.; SILVA, L. G.; REIS, V. M.; DOBEREINER, J. 2000 Ocorrência de bactérias diazotróficas em diferentes genótipos de cana-de-açúcar. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.35, p.985-994.

REIS JUNIOR, F. B.; MACHADO, T. C. T.; MACHADO, A. T.; SODEK, L. 2008 Inoculação de *Azospirillum amazonense* em dois genótipos de milho sob diferentes regimes de nitrogênio. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, v.32, p.1139-1146.

REIS JÚNIOR, F. B.; SILVA, L. G.; REIS, V. M.; DOBEREINER, J. 2000 Ocorrência de bactérias diazotróficas em diferentes genótipos de cana-de-açúcar. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.35, p.985-994.

REIS, V. M. 2007 Uso de bactérias fixadoras de nitrogênio como inoculante para a aplicação em gramíneas. Documento 232, Seropédica, Embrapa Agrobiologia, RJ, 22p.

REIS, V. M.; ESTRADA-DE LOS SANTOS, P.; TENORIO-SALGADO, S.; VOGEL, J.;

STOFFELS, M.; GUYON S.; MAVINGUI, P.; BALDANI, V. L. D.; SCHMID, M.; BALDANI, J. I.; BALANDREAU, J.; HARTMANN, A.; CABALLERO-MELLADO, J. 2004 *Burkholderia tropica* sp. nov., a novel nitrogen-fixing plant-associated bacterium. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v.54, p.1–28.

RODRIGUES, E. P.; RODRIGUES, L. S.; OLIVEIRA, A. L. M.; BALDANI, V. L. D.; TEIXEIRA, K. R. S.; URQUIAGA, S.; REIS, V. M. 2008 *Azospirillum amazonense* inoculation: effects on growth, yield and N<sub>2</sub> fixation of rice (*Oryza sativa* L.) *Plant and Soil*, v.302, p.249–261.

RODRIGUEZ, H.; FRAGA, R. 1999 Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnology Advances*, v.17, p.319–339.

ROMERO, A. M.; CORREA, O. S.; MOCCIA, S.; RIVAS, J. G. 2003 Effect of *Azospirillum*-mediated plant growth promotion on the development of bacterial diseases on fresh-market and cherry tomato. *Journal of Applied Microbiology*, v.95, p.832–838.

RUSCHEL, A. P.; RUSCHEL, R. 1977 Varietal differences affecting nitrogenase activity in rizosphere of sugar cane. *Proceedings for International Society Sugar Cane Technology*, v.2, p.1941-1947.

SALA, V. M. R.; CARDOSO, E. J. B. N.; FREITAS, J. G.; SILVEIRA, A. P. D. 2007 Resposta de genótipos de trigo à inoculação de bactérias diazotróficas em condições de campo. *Pesquisa Agropecuária brasileira*, v.42, p.833-842.

SANTOS, J. M. 2008 Cultura da cana-de-açúcar, crédito de carbono e o desafio do desenvolvimento sustentável. Dissertação de Mestrado. Centro Universitário de Anápolis (Unievangélica), Anápolis, 133p.

SANTOS, M. B.; SILVA, F. C. 2009 Utilização de adubação nitrogenada e potássica em soqueiras de cana-de-açúcar sem queima. Embrapa informática Agropecuária. Disponível em <<http://www.agencia.cnptia.embrapa.br>>. Acesso em 19 de agosto de 2009.

SARIG, S.; KAPULNIK, Y.; OKON, Y. 1986 Effect of *Azospirillum* inoculation on nitrogen fixation and growth of several winter legumes. *Plant and Soil*, v.90, p.335-342.

SILVA, L. G.; MIGUENS, F. C.; OLIVARES, F. L. 2003 Uso da técnica de congelamento por alta pressão no estudo da interação endofítica de *Herbaspirillum seropedicae* e cana-de-açúcar. *Brazilian Journal of Microbiology*, v.34, p.69-71.

SILVEIRA, A. B. 2008 Isolamento e caracterização de linhagens de *Bacillus* e *Paenibacillus* promotores de crescimento vegetal em lavouras de arroz e trigo do Rio Grande do Sul. Tese de doutorado em genética e biologia molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. Plant Physiology. 3ª Ed. Sunderland: Sinauer Associates, 2002. 690p.

TARRAND, J. J.; KRIEG, N. R.; DOBEREINER, J., 1978. A taxonomic study of the *Spirillum lipoferum* group, with descriptions of a new genus, *Azospirillum* gen. nov. and two species, *Azospirillum lipoferum* (Beijerinck) comb. nov. and *Azospirillum brasilense* sp. nov. Canadian Journal of Microbiology, 24:967-980. DOI: 10.1139/m78-160.

TEJERA, N.; LLUCH, C.; MARTÍNEZ-TOLEDO, M. V.; GONZÁLEZ-LOPEZ, G. (2005) Isolation and characterization of *Azotobacter* and *Azospirillum* strains from the sugarcane rhizosphere. Plant and Soil, v.270, p. 223–232. DOI 10.1007/s11104-004-1522-7.

TIEN, T. M.; GASKINS, M. H.; HUBBELL, D. H. 1979 Plant growth substances produced by *Azospirillum brasilense* and their effect on the growth of pearl millet (*Pennisetum americanum* L.). Applied and Environmental Microbiology, v.87, p.1016-1024.

TOMKINS, J. P.; YU, Y.; MILLER, S. H.; FRISCH, D. A.; WOO, S. S.; WING, R. A. 1999 A bacterial artificial chromosome library for sugarcane. Theoretical and Applied Genetics, v.99, p.419–424.

TORTORA, M. L.; DIAZ-RICCI, J. C.; PEDRAZA, R. O. (2011) *Azospirillum brasilense* siderophores with antifungal activity against *Colletotrichum acutatum*. Archives of Microbiology, v.193, p.275–286. DOI 10.1007/s00203-010-0672-7

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE (USDA) - Relatórios. Disponível em <<http://www.usdabrazil.org.br/portugues/reports.asp>>. Acesso em outubro de 2010.

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE (USDA) - Relatórios. Disponível em: <<http://www.fas.usda.gov>>. Acesso em dezembro de 2012.

VIAN, C. E. F. Cana-de-açúcar: Alcoolquímica. Agência de Informação Embrapa. Disponível em <<http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/canade-acucar/Abertura.html>>. Acesso em 20 de agosto de 2009.

VINAGRE, F.; VARGAS, C.; SCHWARCZ, K.; CAVALCANTE, J.; NOGUEIRA, E. M. 2006. SHR5: A novel plant receptor kinase involved in plant-N<sub>2</sub>-fixing endophytic bacteria association. Journal of Experimental Botany, v.57, n.3, p.559–569. DOI: 10.1093/jxb/erj041.



WAACK R. S.; NEVES, M. F. 1998 Competitividade do agrobusiness brasileiro: sistema agroindustrial da cana-de-açúcar. PENSAR/FIA/FEA/USP, São Paulo, v.5, 185p.

WEBER, H.; DAROS, E.; ZAMBON, J. L. C.; IDO, O. T.; BARELA, J. D. Recuperação da produtividade de soqueiras de cana-de-açúcar com adubação NPK. Scientia Agraria, v.2, n.1-2, 2001, pg. 73-77.

XAVIER, J. P. 2006 Contribuição da fixação biológica de nitrogênio na produção sustentável da cultura de Cana-de-Açúcar. Tese em Agronomia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 80p.

YABUUCHI, E.; KOSAKO, Y.; OYAIKU, H.; YANO, I.; HOTTA, H.; HASHIMOTO, Y.; EZAKI, T.; ARAKAWA, M. 1992 Proposal of *Burkholderia* gen. nov. and transfer of seven species of the genus *Pseudomonas* homology group II to the new genus, with the type species *Burkholderia cepacia* (Palleroni and Holmes 1981) comb. nov.. Microbiology Immunology, p.36, p.1251-75.

## CAPÍTULO I - SELEÇÃO DE FAMÍLIAS DE CANA-DE-AÇÚCAR COM MELHOR ASSOCIAÇÃO A RIZOBACTÉRIAS PROMOTORAS DO CRESCIMENTO VEGETAL (PGPR) <sup>1, 2, 3</sup>

### RESUMO

A capacidade das cultivares de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) responderem a rizobactérias promotoras de crescimento vegetal (PGPR) está associada com a eficiência da estirpe da bactéria, mas também à capacidade da planta em responder a inoculação. Por este motivo não só a seleção de estirpes de bactérias, mas a seleção de genótipos de cana-de-açúcar mais responsivos é necessária. Com base nesses preceitos o presente estudo objetivou avaliar a resposta de 54 famílias de cana-de-açúcar à inoculação com estirpes de *Azospirillum brasilense*. As famílias provenientes de 54 cruzamentos entre clones de cana-de-açúcar foram tratadas com um inoculante (denominado Triazo) composto por três estirpes de *A. brasilense*, Abv5, Abv6 e Abv7, ou com um inoculante constituído pela estirpe IC26 apenas. O tratamento foi realizado quatro meses após a semeadura e então as plantas foram levadas a campo. As avaliações foram realizadas 14 meses após o plantio, usando-se caracteres de produtividade como parâmetro. Diferenças significativas entre os tratamentos foram observadas para estatura da planta, diâmetro do colmo e brix. Foi observada diferença significativa para a interação família x inoculante, diâmetro de colmo e brix, bem como valores de interação positivos (0,7272 para brix e 0,4061 para diâmetro de colmo) ou negativos (-0,5514 para brix e -0,18858 para diâmetro de colmo), de acordo com a família e inoculante usado. Portanto, em um programa de melhoramento genético de cana-de-açúcar visando à seleção de genótipos com melhor resposta a inoculação com PGPR, a inoculação dos *seedlings* na primeira fase de seleção é recomendada.

**Palavras-chave:** interação planta-bactéria, PGPR, melhoramento de plantas, *Azospirillum brasilense*, bactéria fixadora de nitrogênio.

### ABSTRACT

The capacity of the sugarcane (*Saccharum* spp.) plant to respond to Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) is associated with both the efficiency of the bacterial strain and the capacity of the plant to respond to inoculation. For this reason, the appropriate selection of

---

<sup>1</sup> Artigo publicado na Revista Journal of Agronomy

<sup>2</sup> As normas desse capítulo seguem às da Revista Journal of Agronomy

<sup>3</sup> Esse capítulo refere-se ao Experimento 1

both the bacterial strain and the sugarcane genotype is required for generating optimal results from PGPR inoculations. To address this issue, this study sought to evaluate the response of 54 sugarcane families to inoculation with *Azospirillum brasilense* strains. Four months after germination, 54 families from crosses between clones of sugarcane were treated either with an inoculant named Triazo, which was composed of a mixture of the Abv5, Abv6 and Abv7 strains of *A. brasilense*, or with the IC26 strain of *A. brasilense*. The treated plants were then planted in fields. These plants were assessed 14 months after they had been planted on the basis of various productivity parameters. Significant differences among the inoculants were observed for stalk length, stalk diameter and brix. Significant interactions between the families and bacteria occurred with respect to stalk diameter and brix; the interaction coefficients could have either positive (0.7272 for brix and 0.4061 for stalk diameter) or negative (-0.5514 for brix and -0.1858 for stalk diameter) values, depending on the family and the inoculant that were considered. Therefore, the inoculation of the seedling in the first phase of selection is recommended for a sugarcane breeding program that seeks to select genotypes with better responses to PGPR inoculation.

**Keywords:** plant-bacteria interaction, PGPB, plant breeding, *Azospirillum brasilense*, nitrogen-fixing bacteria

#### 4.1 INTRODUÇÃO

O gênero *Azospirillum* compreende as bactérias promotoras de crescimento vegetal (PGPR) mais estudadas no mundo (Bashan e Holguin, 1997). A espécie *Azospirillum brasilense* é considerada uma rizobactéria (Broek et al., 1993; Assmus et al., 1995) envolvida na associação com diversas espécies vegetais (Bashan et al., 2004). Foi descrita pela primeira vez como *Spirillum lipoferum* (Döbereiner e Day, 1976), sendo reclassificada como *A. brasilense* em 1978 (Tarrand et al., 1978) e desde então estudada por sua capacidade de fixar nitrogênio (Bashan e Bashan, 2011).

Além da fixação biológica de nitrogênio (FBN), outros benefícios têm sido atribuídos a essa bactéria (Bashan et al., 1990; Verma et al., 2010), como a produção de reguladores vegetais, proliferação do sistema radicular, maior absorção de água e micronutrientes, solubilização de fosfato e mobilização de nutrientes. Recentemente outros mecanismos de ação foram descobertos e atribuídos a esta bactéria como transporte de moléculas de pequeno porte e enzimas, aumento da atividade do fluxo de prótons da membrana, controle direto e indireto de fitopatógenos e mitigação de estresses ambientais como o salino (Bashan e Bashan, 2011) e o estresse hídrico (Arzanesh et al., 2009).

Inúmeros trabalhos foram realizados com o objetivo de selecionar estirpes de bactérias mais eficiente (Shaukat et al., 2006; Hungria et al., 2010; Keyeo et al., 2011), porém os resultados têm mostrado uma eficiência variável na capacidade dessas bactérias em fixar

nitrogênio e promover o desenvolvimento vegetal (Bashan e Levanony, 1990). Alguns resultados continuam apontando para a necessidade da seleção não somente de bactérias, mas também de genótipos de plantas mais responsivos (Muños-Rojas e Caballero-Mellado, 2003; De Oliveira et al., 2006).

A interação entre plantas e bactérias é dependente do genótipo da planta, da espécie e estirpe da bactéria, da presença de outros microrganismos e das condições ambientais (Baldani e Baldani, 2005; Oliveira et al., 2009). Vários experimentos enfatizam a importância do efeito do genótipo vegetal na interação planta-bactéria. Entretanto, os trabalhos realizados têm dado pouca ênfase a seleção de genótipos de Poaceas que respondam a inoculação com PGPB, exceto aqueles feitos em milho (De Mendonça et al., 2006), trigo (Sala et al., 2007) e arroz (Ladha et al., 1987).

Atualmente, em cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.), os estudos estão focados na avaliação da resposta de cultivares comerciais à inoculação com PGPB (Coelho et al., 2003; Hari e Srinivasan, 2005), sendo que a busca de genótipos de cana-de-açúcar com interação positiva à bactérias promotoras de crescimento não está entre os objetivos dos programas de melhoramento.

Dessa forma, o conhecimento das diferentes respostas de famílias de cana-de-açúcar a inoculação com PGPB na fase inicial do programa de melhoramento genético, onde a variabilidade genética é alta, pode ajudar a entender se essa interação ocorre de fato e qual a sua magnitude. Esses resultados podem auxiliar os pesquisadores em novos estudos e aos melhoristas a planejarem novas estratégias de seleção. Com base nisso, o propósito deste trabalho foi avaliar diferentes cruzamentos de cana-de-açúcar (famílias) e sua resposta a inoculação com *A. brasilense* na fase inicial do programa de melhoramento de cana-de-açúcar, objetivando selecionar as famílias mais responsivas.

## 4.2 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.2.1 Local de instalação do experimento

O experimento foi conduzido na Estação Experimental de Paranavaí da Universidade Federal do Paraná, no município de Paranavaí/PR (23°05'S, 52°27'W, altitude de 503 m), nos anos de 2009 e 2010. O clima da região de acordo com classificação de Köppen é o Cfa, clima

Subtropical Úmido (Mesotérmico), com temperatura média do mês mais quente superior a 22° C e no mês mais frio inferior a 18° C, sem estação seca definida, verão quente e geadas menos frequentes (IAPAR, 1994).

O solo da área experimental é classificado como Ferralsol (Dystric) (FAO, 2006). As principais características químicas do solo no momento do estabelecimento do experimento estão na Tabela 1.

**Tabela 1:** Propriedades químicas do solo (0-40 cm) no estabelecimento do experimento.

pH CaCl <sub>2</sub>	Al cmol <sub>c</sub>	H+Al dm <sup>-3</sup>	Ca	Mg	K	CEC <sup>a</sup>	T <sub>CEC</sub> <sup>a</sup>	BS <sup>a</sup> %	N	C g.dm <sup>-3</sup>	P
6.45	0.00	2.025	0.65	0.95	0.02	3.59	1.58	43.57	0.10	11.97	10.72

<sup>a</sup> Capacidade de troca de cátions (H+Al+Ca+Mg+K); TCEC (Ca+Mg+K); Saturação de bases (Tcec/CEC) × 100

#### 4.2.2 Material vegetal

Foram utilizadas sementes (cariopses) provenientes de 53 cruzamentos biparentais e um policruzamento entre clones de cana-de-açúcar, realizados na Estação de Cruzamento da Serra do Ouro, em Alagoas, no ano de 2008 (Tabela 2). As sementes foram germinadas em casa de vegetação com irrigação constante, em bandejas plásticas contendo como substrato Plantmax®, em novembro de 2008.

**Tabela 2:** Relação das 54 famílias da série 2008 utilizadas e cruzamentos de origem.

Família	Cruzamento	Família	Cruzamento	Família	Cruzamento
1	H64-1881 x RB92579	19	RB99386 X SP79-2313	37	RB867515 X RB977619
2	SP83-5073 X RB92579	20	RB813804 X RB72910	38	RB855511 X RB92606
3	RB951560 X RB867515	21	RB977625 X RB008004	39	RB966928 X RB935845
4	RB01616 X H64-1881	22	RB040826 X RB855035	40	SP83-2847 X RB855546
5	RB99386 X SP91-1049	23	RB855002 X RB93509	41	RB855536 X RB925268
6	RB001622 X RB92579	24	RB966922 X ? <sup>1</sup>	42	RB855063 X SP77-5181
7	RB93509 X RB845257	25	RB961012 X RB931011	43	RB855113 X SP77-5181
8	RB977662 X RB92579	26	RB011579 X RB991555	44	RB925345 X RB935686
9	RB845210 X RB931003	27	RB977619 X RB867515	45	RB72454 X RB951019
10	RB011579 X RB92579	28	SP80-1842 X RB98710	46	SP77-5181 X RB855113
11	RB832847 X RB845210	29	RB99361 X RB98710	47	RB845210 X SP83-2847
12	RB956911 X RB93509	30	RB931003 X RB855336	48	SP85-3877 X RB931565
13	RB021698 X RB977625	31	H69-4234 X RB01616	49	RB955114 X RB845197
14	RB925378 X SP80-185	32	RB01616 X H69-4234	50	RB855546 X RB925276
15	RB008309 X RB974115	33	RB040811 X RB845197	51	H64-1881 X RB01616
16	RB99382 X RB98710	34	RB951541 X RB947520	52	RB99386 X SP79-2313
17	B69758 X SP93-1322	35	RB965505 X SP70-1143	53	RB92579 X H64-1881
18	RB98347 X RB98710	36	RB92606 X H56-6724	54	RB971765 X RB93509

<sup>1</sup> pai desconhecido

As plântulas (*seedlings*) foram transplantadas quarenta dias após a semeadura, para bandejas de isopor com células individuais (6 cm<sup>3</sup>) permanecendo em telado (50%) até o momento do plantio. Quatro meses após a semeadura as plantas foram tratadas com inoculantes a base de estirpes de *A. brasilense*, permanecendo em telado (50%) por mais sete dias, seguindo-se então o plantio em campo (dando início à primeira fase do programa de melhoramento genético de cana-de-açúcar, denominado T1).

#### 4.2.3 Estirpes utilizadas

As estirpes Abv5, Abv6, Abv7 e IC26 de *A. brasilense* foram fornecidas pela UFPR - Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Curitiba, Paraná. As estirpes Abv5, Abv6 e Abv7 foram isoladas de milho (Hungria et al., 2010) e a estirpe IC26 é um mutante natural que possui atividade constitutiva da nitrogenase. As estirpes Abv5 e Abv6 apresentaram capacidade de produzir ácido indol acético (AIA) e reduzir acetileno em etileno *in vitro* (Pedrinho et al., 2010).

#### 4.2.4 Inoculantes

As estirpes de *A. brasilense* foram cultivadas separadamente em meio NFb (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 4,0 g.l<sup>-1</sup>; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 6,0 g.l<sup>-1</sup>; MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O; 0,2 g.l<sup>-1</sup>; NaCl; 0,1 g.l<sup>-1</sup>; CaCl<sub>2</sub>; 0,2 g.l<sup>-1</sup>; ácido nitrilotriacético; 0,056 g.l<sup>-1</sup>; FeSO<sub>4</sub>.7 H<sub>2</sub>O; 0,2 g.l<sup>-1</sup>; Biotina; 1,0.10<sup>-4</sup> g.l<sup>-1</sup>; Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>.2 H<sub>2</sub>O; 0,002 g.l<sup>-1</sup>; MnSO<sub>4</sub>. H<sub>2</sub>O; 0,00235 g.l<sup>-1</sup>; H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>; 0,0028 g.l<sup>-1</sup>; CuSO<sub>4</sub>.5 H<sub>2</sub>O; 8,0.10<sup>-5</sup> g.l<sup>-1</sup>; ZnSO<sub>4</sub>.7 H<sub>2</sub>O; 2,4.10<sup>-4</sup> g.l<sup>-1</sup>) a 30 °C (Densidade óptica:1,5-1,8) por 48 h. 5 mmol.L<sup>-1</sup> glutamato foram usados como fonte de nitrogênio e 0,5% de lactato de sódio como fonte de carbono. Após autoclavados foram adicionados ao meio de cultura frio e o pH foi ajustado para 6,8. Após o crescimento das estirpes estas foram adicionadas a uma solução de polyvinyl pyrrolidona (PVP) a 5%. As estirpes Abv5, Abv6 e Abv7 foram misturadas formando um inoculante chamado Triazo. A estirpe IC26 foi usada separadamente formando outro inoculante.

#### 4.2.5 Inoculação

As plantas de cada família foram tratadas da seguinte forma: plantas não inoculadas Controle (T0); plantas inoculadas com *A. brasilense* estirpe IC26 ( $1 \times 10^{10}$  bactérias.mL<sup>-1</sup>) (T1); plantas inoculadas com Triazo ( $3 \times 10^9$  bactérias.mL<sup>-1</sup>) (T2).

A inoculação foi realizada nas plantas quando estas ainda estavam na bandeja de isopor, quatro meses após a semeadura. Foram aplicados 100 µl de inoculante, nas concentrações acima mencionadas, na base do colo de cada plântula utilizando-se micropipeta, de acordo com o inoculante utilizado.

#### 4.2.6 Delineamento experimental

O delineamento experimental foi de blocos completos com parcelas subdivididas, com três repetições. Cada bloco foi composto por 54 parcelas, sendo que cada parcela representava uma família. Cada parcela foi composta por três linhas de 5 m de comprimento contendo 10 plantas cada, e por sua vez cada linha representou um inoculante (T0, T1 e T2) - subparcela. O espaçamento utilizado foi o de 1,40 m entre linhas e 0,50 m entre plantas, com uma área total de 5.000 m<sup>2</sup>. Como bordadura foi utilizado o clone RB986419.

O plantio foi realizado em fevereiro de 2009. A adubação foi realizada na linha de plantio, sendo que cada linha de 5 m recebeu 540g de cloreto de potássio e 180g de superfostato simples, sem adição de adubo nitrogenado. O manejo seguiu o padrão para a cultura da cana-de-açúcar, com aplicação de herbicida pré-emergência, capinas pós-emergência, sem irrigação.

#### 4.2.7 Avaliações

As avaliações foram realizadas 14 meses após o plantio e os parâmetros estimados foram: número de colmos por parcela, estatura da planta (em metros, a partir da primeira folha com o *dewlap* visível até a base do colmo), diâmetro dos colmos (em centímetros no terceiro entrenó a partir da base) e brix.

#### 4.2.8 Análise estatística

Os dados de todos os parâmetros foram analisados usando o software Selegen REML/BLUP (De Resende, 2006) para determinar a diferença significativa entre as famílias, tratamentos e suas interações. O software estima os componentes de variância e predição de valores genéticos pelo procedimento de melhor predição linear não tendencioso-máxima verossimilhança restrita (REML/BLUP). O modelo estatístico usado segue abaixo:

$$y = Xa + Zb + Wp + Qr + T(axb) + e,$$

Onde  $y$  é o vetor de dados,  $a$  é o vetor do efeito do fator A (assumido como fixo, alocados na parcela) adicionados à média geral,  $b$  é o vetor de efeito genotípico associado à sub-parcela (nível do fator B dentro do fator A, assumido como aleatório),  $p$  é o vetor dos efeitos de parcelas ou do erro associados à interação do fator A com o fator repetições (assumidos como aleatórios),  $r$  é o vetor dos efeitos de blocos ou repetições (assumidos como aleatórios),  $a \times b$  é vetor dos efeitos da interação genótipo x fator A (aleatórios) e  $e$  é o vetor de erros ou resíduos (aleatórios). As letras maiúsculas representam as matrizes de incidência para os referidos efeitos (De Resende, 2006).

#### 4.3 RESULTADOS

Os resultados obtidos pela Análise de Deviance (ANADEV) são semelhantes à Análise de variância (ANOVA). Entretanto, esta metodologia permite maior acurácia uma vez que prediz valores genotípicos ao invés de valores fenotípicos, em outras palavras, reduz o efeito do ambiente. Esta metodologia permite a análise de dados desbalanceados, com perda de parcelas e repetições. Por esta razão é recomendado para as análises no melhoramento genético de cana-de-açúcar, principalmente quando se trabalha com o estudo de famílias e nas fases iniciais de seleção. Os resultados da ANADEV estão na Tabela 3.

Os resultados da ANADEV mostraram que houve diferença significativa entre as famílias a 1% de probabilidade para todos os parâmetros, indicando a alta variabilidade genética presente nessa fase de seleção do programa de melhoramento genético de cana-de-açúcar.



**Tabela 3:** Resultados da análise de Deviance para os caracteres: número de colmos por touceira (NCT), estatura da planta (EST), diâmetro do colmo (DIA) e brix, após 14 meses.

Efeito	Caractere (Valor F)			
	NC	EST	DIA	Brix
Família	28,30***	9,04***	13,17***	41,89***
Tratamento	0,00 <sup>ns</sup>	16,96***	9,07***	30,77***
Bloco	6,54**	53,51***	24,77***	17,21***
Interação Fam. x Trat.	2,11 <sup>ns</sup>	2,09 <sup>ns</sup>	2,97 *	25,92***
C.V.%	18,88	7,79	6,48	4,37

\*\*\* significativo a 1% (6,63); \*\* significativo a 5% (3,84); \* significativo a 10% (2,71); e <sup>ns</sup> não significativo.

Houve diferença significativa para o efeito tratamento a 1% de probabilidade para os parâmetros estatura média, diâmetro de colmo e brix (Tabela 4). Plantas tratadas com IC26 apresentaram valores superiores de diâmetro (2,340 cm) seguido por plantas tratadas com Triazo (2,332 cm) e o controle (2,309 cm). Já para a variável brix foi encontrado um resultado contrário, em que plantas não inoculadas apresentaram valores superiores (19,119) comparadas com plantas tratadas com Triazo (18,954). Entretanto plantas tratadas com IC26 apresentaram os maiores valores de brix (19,208). Plantas inoculadas com IC26 apresentaram altos valores para o parâmetro estatura da planta (2,298 m) seguida por plantas tratadas com Triazo (2,285 m) e o controle (2,279 m).

**Tabela 4:** Resultado dos tratamentos para os caracteres: número de colmos por touceira (NCT), estatura da planta (EST), diâmetro do colmo (DIA) e brix médio, após 14 meses.

Tratamento	Média para cada caractere			
	NCT <sup>ns</sup>	EST (m) ***	DIA (cm) ***	brix ***
Não inoculado	8,942	2,279	2,309	19,119
Triazo	8,705	2,285	2,332	18,954
IC26	9,037	2,298	2,340	19,208

\*\*\* significativo a 1% (6,63); e <sup>ns</sup> não significativo.

Esses resultados mostraram um efeito positivo da inoculação da cana-de-açúcar com *A. brasilense* para todos os parâmetros estudados, mas um efeito negativo do inoculante Triazo para o caractere brix (Tabela 4).

Houve diferença significativa no efeito do bloco para todas as variáveis analisadas, indicando que houve influência do solo ou luz nas plantas, embora os blocos tenham sido casualizados (Tabela 3). Este resultado é esperado em experimentos de campo, uma vez que o solo não é homogêneo, mas o baixo valor do coeficiente de variação indicou que a precisão experimental foi adequada.

O efeito interação família-tratamento apresentou diferença estatística para os

parâmetros brix (a 1% de probabilidade) e diâmetro do colmo (a 10%), indicando que a resposta à inoculação variou de acordo com a família testada (Tabela 5). Os demais parâmetros não apresentaram diferença significativa para este efeito.

**Tabela 5:** Resumo das 10 melhores famílias (com o respectivo valor genotípico) para as características brix médio e diâmetro do colmo, bem como o valor correspondente da interação família x tratamento (F x T), após 14 meses.

Ordem	Diâmetro do colmo *		Brix ***	
	F x T	Valor da Interação	F x T	Valor da Interação
1	43 x T0	-0,0034	1 x T0	0,3819
1	43 x IC26	0,0254	1 x IC26	0,0699
1	43 x TRIAZO	0,0251	1 x TRIAZO	-0,5514
2	8 x T0	0,4061	2 x T0	0,213
2	8 x TRIAZO	-0,1858	2 x IC26	0,0897
2	8 x IC26	0,0047	2 x TRIAZO	0,1451
3	38 x T0	0,0249	6 x T0	0,7272
3	38 x IC26	0,045	6 x IC26	-0,2932
3	38 x TRIAZO	-0,0301	6 x TRIAZO	-0,0413
4	32 x T0	0,0061	4 x T0	-0,5045
4	32 x IC26	0,0324	4 x IC26	0,4341
4	32 x TRIAZO	-0,0054	4 x TRIAZO	0,073
5	50 x T0	0,0224	5 x T0	-0,1036
5	50 x IC26	0,0225	5 x IC26	0,1383
5	50 x TRIAZO	-0,0121	5 x TRIAZO	0,2874
6	30 x T0	0,0059	24 x T0	0,4156
6	30 x IC26	-0,0021	24 x IC26	-0,4265
6	30 x TRIAZO	0,025	24 x TRIAZO	0,2991
7	2 x T0	0,013	26 x T0	0,1798
7	2 x IC26	-0,0056	26 x IC26	0,1862
7	2 x TRIAZO	0,0206	26 x TRIAZO	-0,0898
8	40 x T0	0,0056	37 x T0	-0,4287
8	40 x IC26	-0,0042	37 x IC26	0,6071
8	40 x TRIAZO	0,0054	37 x TRIAZO	0,0886
9	9 x T0	-0,0209	9 x T0	-0,0968
9	9 x IC26	0,0239	9 x IC26	-0,0461
9	9 x TRIAZO	-0,0229	9 x TRIAZO	0,3047
10	52 x T0	0,0119	10 x T0	-0,0146
10	52 x IC26	-0,0118	10 x IC26	0,289
10	52 x TRIAZO	0,0211	10 x TRIAZO	-0,202

\*\*\* significativo a 1% (6,63), \* significativo a 10% (2,71).

As melhores famílias para cada variável estão na Tabela 6. Foram observadas diferenças na ordem das famílias dependendo da variável analisada. As famílias 43 (RB855113 x SP77-5181), 50 (RB855546 x RB925276), 30 (RB931003 x RB855336), 6

(RB001922 x RB92579), 8 (RB977662 x RB92579) e 2 (SP83-5073 x RB92579) foram consideradas as melhores para mais de um parâmetro.

**Tabela 6:** Valor genotípico (VG) das 10 melhores famílias, para os caracteres: número de colmos por touceira (NCT), estatura da planta (EST), diâmetro do colmo (DIA) e brix, após 14 meses.

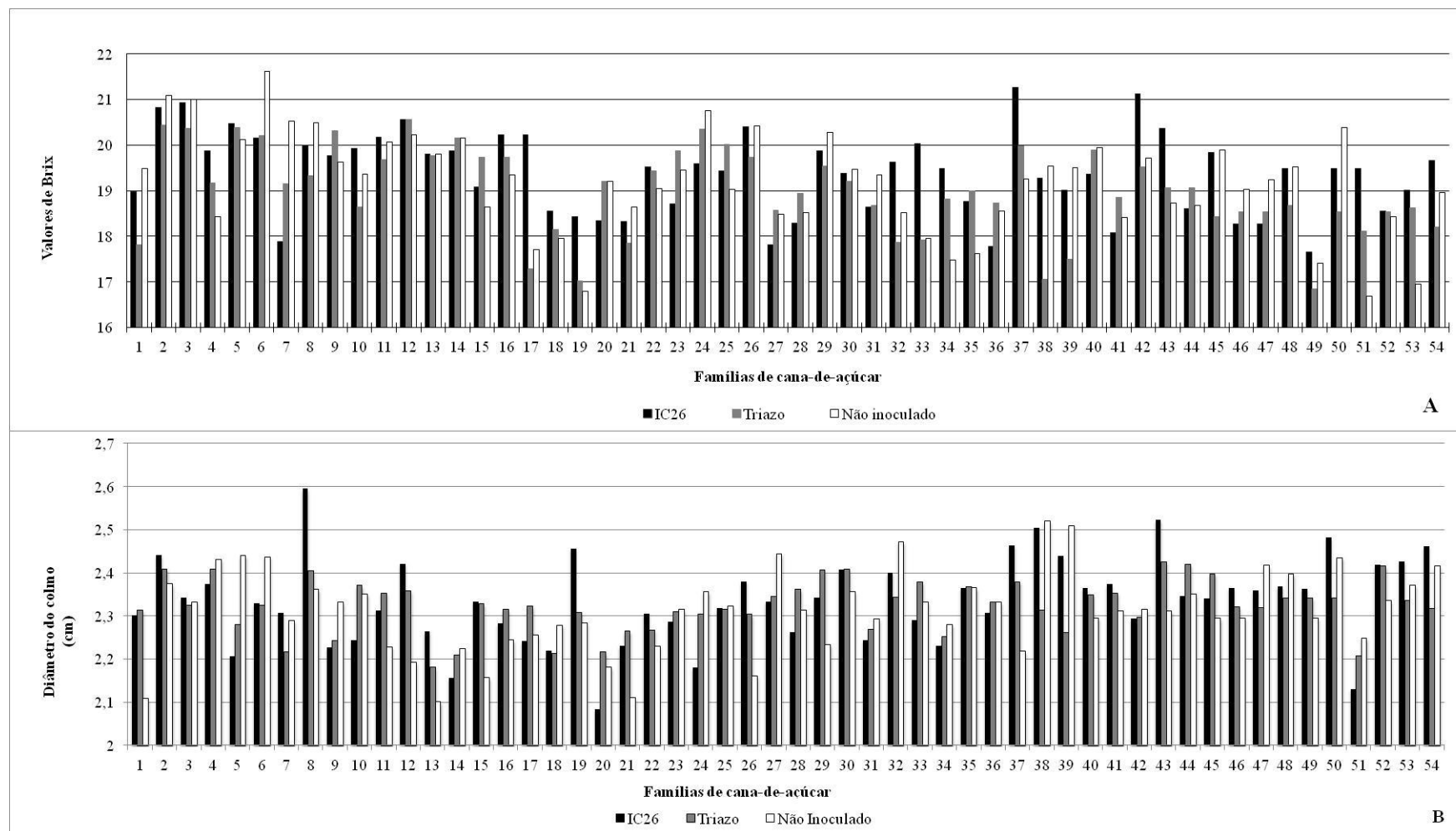
Ordem	Caracteres avaliados							
	NC		EST		DIA		brix	
	Família	VG <sup>1</sup>	Família	VG	Família	VG	Família	VG
1	30	12,485 a <sup>2</sup>	20	2,437 a	43	2,482 a	3	20,671 a
2	43	11,186 a	27	2,412 a	8	2,466 a	2	20,658 a
3	46	10,983 a	11	2,401 a	38	2,458 a	6	20,466 a
4	31	10,964 a	6	2,386 a	32	2,436 a	12	20,298 a
5	16	10,840 a	25	2,383 a	50	2,435 a	5	20,219 a
6	45	10,626 b	17	2,382 a	30	2,422 a	24	20,100 a
7	44	10,563 b	43	2,373 a	2	2,420 a	26	20,059 a
8	47	10,319 b	10	2,369 a	4	2,412 a	37	20,027 a
9	50	10,247 b	8	2,357 a	54	2,410 a	42	20,011 a
10	41	9,939 b	50	2,355 a	52	2,397 a	14	19,989 a

<sup>1</sup> Valor genotípico; <sup>2</sup> Teste de Student, números seguidos pela mesma letra na coluna não diferem estatisticamente a 1% de probabilidade.

Na Fig.1 (A), pode-se ver a média para o parâmetro brix para cada família estudada. De acordo com o gráfico, a média desse caractere mudou de acordo com a família, para todos os tratamentos, mostrando que a inoculação pode promover efeitos negativos e positivos na produtividade dependendo da família avaliada. Um exemplo é a família 6 (RB001922 X RB92579) que apresentou um alto valor de brix quando não inoculada e um baixo valor quando inoculada com Triazo e IC26. Por outro lado a família 37 (RB867515 X RB977619) apresentou melhores resultados para brix quando inoculada com triazo e IC26 e baixos valores quando não inoculada.

Valores similares foram observados para diâmetro do colmo Figura 1 (B), em que plantas da família 6 e 37 apresentaram respostas equivalentes para aumento e redução, respectivamente. Outro exemplo são as plantas da família 44 (RB925345 X RB935686) que apresentaram maior diâmetro de colmo quando inoculadas com Triazo, e plantas da família 5 (RB99386 X SP91-1049) que apresentaram maior diâmetro quando não inoculadas. Esses resultados mostram a importância de inocular as plantas ainda nas fases iniciais dos programas de melhoramento.

**Figura 1:** Valores genotípicos de brix (A) e diâmetro de colmo (B) de 54 famílias de cana-de-açúcar de acordo com os diferentes tratamentos utilizados (não inoculado, inoculado com Triazo e inoculado com IC26), 14 meses após o plantio.



#### 4.3.1 Interação família x tratamento

Na Tabela 5 estão as 10 melhores famílias de acordo com o valor genotípico e os valores de interação família x tratamento. Estes valores mostraram-se variáveis entre as famílias, e foram observados valores positivos e negativos na mesma família, dependendo da variável analisada.

Um exemplo é a família 1 (H64-1881 x RB92579), que apresentou interação positiva para a variável brix quando não inoculado (0,382) e resposta negativa quando inoculada com Triazo (-0,5514) (Tabela 5). Uma resposta similar foi observada na família 6 (RB001922 X RB92579) em que a interação foi positiva em plantas não inoculadas (0,727) e negativa em plantas tratadas com IC26 (-0,293)

Embora essa fase de seleção apresente um grande número de genótipos e uma alta variabilidade genética, é possível observar uma interação específica entre as famílias de cana-de-açúcar e os inoculantes de *A. brasilense*, ou uma interação genótipo-bactéria. Como observado, há uma interação positiva ou negativa para a mesma família dependendo do inoculante de *A. brasilense*. A família 24 (RB966922 X ? - policruzamento) também apresentou interação positiva para brix quando inoculada com Triazo (0,299) e interação negativa quando tratada com IC26 (-0,426), indicando que nesse caso a resposta pode variar de acordo com inoculante usado. Por esta razão, sugerem-se estudos com diferentes inoculantes.

### 4.4 DISCUSSÃO

#### 4.4.1 Diferença genética entre as famílias

As diferenças estatísticas observadas entre as famílias para todos os parâmetros avaliados eram esperadas. Nessa fase de seleção do melhoramento de cana-de-açúcar a variabilidade genética da população é alta, indicando que a condição é favorável à seleção (Ferreira et al., 2005; Lopes et al., 2008).

#### 4.4.2 Efeito da inoculação no desenvolvimento das plantas

Observou-se que houve diferença significativa para os caracteres brix, estatura e

diâmetro do colmo. Esses resultados corroboram com Biari et al. (2008) que relataram ter diferentes respostas em milho quando inoculados com bactérias promotoras de crescimento vegetal (PGPB) dependendo do caractere avaliado. Ovando-Medina et al. (2007) verificaram que plantas de *Alpinia purpurata* inoculadas com *Azospirillum brasilense* também apresentaram maior diâmetro de colmo que plantas não inoculadas

Em média, as plantas de cana-de-açúcar que foram inoculadas apresentaram melhores resultados para estatura, diâmetro e brix, quando comparadas às plantas não inoculadas (Tabela 4). Hungria et al. (2010) também observaram variação no aumento da produtividade em plantas de trigo e milho inoculadas com *A. brasilense* (estirpes Abv5, Abv6, Abv7 e outras), quando comparadas com plantas não inoculadas, mostrando um efeito positivo dessas estirpes no desenvolvimento de plantas dessas duas espécies.

As plantas do presente estudo exibiram melhor resposta média quando inoculadas com IC26 em relação àquelas inoculadas com Triazo (para os caracteres estatura, diâmetro do colmo e brix) (Tabela 4). Este resultado não era esperado, pois a associação com diversas bactérias normalmente promove melhor resposta no desenvolvimento das plantas que uma estirpe/espécie sozinha, como demonstrado em vários estudos (Oliveira et al., 2009; Baldani e Baldani, 2005; Oliveira et al., 2009). Não obstante, no presente estudo o fator interação mostrou que estes resultados podem variar dependendo da família (Tabela 5).

De acordo com Baldani e Baldani (2005) o efeito da inoculação na produtividade das plantas é dependente tanto do genótipo da planta quanto da estirpe da bactéria utilizada. Assim, diferentes resultados na inoculação são esperados quando se trabalha com diferentes estirpes e diferentes genótipos. Muños-Rojas e Caballero-Mellado (2003) também encontraram diferentes resultados em termos de produtividade para vários caracteres de cana-de-açúcar, quando testaram diferentes cultivares, com sete estirpes de *G. diazotrophicus*. Estes autores observaram que plantas da variedade MEX57-473 inoculadas com a estirpe PA13 exibiram valores inferiores de massa seca de raiz e parte aérea quando comparadas com plantas não inoculadas. A superioridade dos valores observados nas plantas não inoculadas, para estes parâmetros, indica que o efeito de um inoculante pode ser negativo para determinadas cultivares.

Um efeito negativo da interação também foi observado na cultivar de cana-de-açúcar B4362. No Brasil, a cultivar B4362 é a única variedade suscetível à estria mosqueada, causada pela bactéria *Herbaspirillum rubrisubalbicans* (Olivares et al., 1997), pois quando inoculada com *H. rubrisubalbicans* essa cultivar apresenta os sintomas característicos da doença. Esse resultado concorda com aqueles encontrados por Urquiaga et al. (1992), que em seu trabalho

sugere que fatores genéticos da planta podem controlar o processo de reconhecimento, colonização e fixação de nitrogênio.

Uma interação específica entre cana-de-açúcar e *A. brasilense* também foi observada em um estudo de Moutia et al. (2010), que inoculou duas cultivares contrastantes de cana-de-açúcar com *A. brasilense* (estirpes Azo 195, Azo 249 e Azo 274). Estes autores observaram que a cv. M 1176/77 respondeu positivamente a inoculação, enquanto a cv. R 570 respondeu negativamente, indicando que o genótipo vegetal deve ser levado em consideração quando se inoculam plantas com essas bactérias, resultados esses que concordam com os obtidos no presente estudo.

#### 4.4.3 Aumento no teor de sólidos solúveis (brix) nas plantas

A diferença significativa observada para o caractere brix, 14 meses após o plantio, indica que no geral houve um aumento do valor deste caractere quando as plantas foram inoculadas com estirpes de *A. brasilense*. Entretanto, também foram observadas diferenças significativas para o fator interação planta-bactéria (Tabela 3). Porém, mais especificamente, a associação das três estirpes de *A. brasilense* (Triazo) promoveu a redução no brix médio, enquanto a inoculação com IC26 promoveu valores superiores em comparação com o tratamento controle (T0, não inoculado) (Tabela 4).

Hari e Srinivasan (2005) verificaram que a inoculação de certas variedades de cana-de-açúcar com diferentes espécies de bactérias (*G. diazotrophicus*, *Azotobacter chroococcum* e *A. brasilense*) promoveram altos valores no conteúdo de açúcar daquelas variedades, entretanto, estes autores não mencionaram os possíveis fatores que podem ter influenciado nesse resultado.

No caso da cana-de-açúcar, o melhor entendimento sobre o metabolismo do processo fotossintético e o sistema de transporte e de acúmulo dos metabólicos, particularmente sacarose, é necessário (Papini-Terzi et al., 2009). É possível que os altos valores de brix encontrados nas plantas inoculadas com IC26 estejam relacionados com o alto teor de nitrogênio, uma vez que esta estirpe apresenta atividade constitutiva da nitrogenase. Por outro lado, Koochekzadeh et al. (2009), mencionam que a aplicação de diferentes níveis de fertilizantes nitrogenados não tem mostrado efeitos significativos sobre essa característica em cana-de-açúcar.

A disponibilidade de nitrogênio orgânico pode influenciar fortemente a capacidade

fotossintética das plantas (Donato et al., 2004) e o alto teor de clorofila encontrado em plantas inoculadas com *Azospirillum* (Zaied et al., 2003; Bashan et al., 2006) pode estar relacionado a sua alta taxa fotossintética (Wolff e Floss, 2004). Entretanto, mais estudos devem ser realizados com o objetivo de esclarecer o alto conteúdo de açúcar observado nas plantas inoculadas com PGPB e a sua relação com o nitrogênio.

Ressalta-se que, devido ao grande número de genótipos avaliados, a análise de nitrogênio e outras análises mais complexas não são viáveis nessa fase inicial do programa de melhoramento de cana-de-açúcar. No entanto, recomenda-se esse tipo de análise em fases mais avançadas do programa de melhoramento, onde há menor número de indivíduo, com o objetivo de confirmar os resultados obtidos.

#### 4.4.4 Interação família x tratamento

Os resultados encontrados no presente estudo mostraram valores significativos de interação entre as famílias e o inoculante. Algumas famílias apresentaram resposta positivas a inoculação como a 4 (RB01616xH64-1881), 37 (RB867515xRB977319), 5 (RB99386xSP91-1049) e 9 (RB845210xRB91003), enquanto outras famílias apresentaram resposta negativa, como as famílias 1 (H64-1881xRB92579), 6 (RB001922xRB92579) e 24 (RB966922x policruzamento).

Moutia et al. (2010) encontraram valores significativos de interação entre duas cultivares contrastantes de cana-de-açúcar (R570 e M1176/77) quando tratadas com um inóculo composto por três estirpes de *A. brasilense*, ou não inoculadas, em diferentes regimes hídricos (com e sem estresse). Embora estes autores tenham usado somente um inoculante, os resultados encontrados por eles são semelhantes aos encontrados no presente estudo, onde foi confirmada a existência de uma interação específica entre bactérias do gênero *Azospirillum* e genótipos de cana-de-açúcar.

A interação observada sugere que o genótipo de cana-de-açúcar desempenha um importante papel no sucesso da associação com PGPB. Diferentes autores identificaram genes envolvidos no reconhecimento de interações benéficas e patogênicas em cana-de-açúcar, como os genes SHR5 (Vinagre et al., 2006), e o scGS1.b, que é diferentemente expresso em duas cultivares contrastantes de cana-de-açúcar, SP70-1143 (alta FBN) e Chuneer (baixa FBN) (Nogueira et al., 2005).

A complexidade genética da cana-de-açúcar, com ausência e duplicação de



cromossomos (poli-aneuploide), pode contribuir significativamente para os altos valores de interação obtidos no presente estudo, uma vez que o sucesso da associação pode estar relacionado com apenas um ou poucos genes (Nogueira et al., 2005; Vinagre et al., 2006). Assim, as distintas respostas das famílias ao tratamento com PGPR podem estar ligadas a expressão desses genes.

Outros mecanismos também estão relacionados a características das cultivares de cana-de-açúcar (Baldani e Baldani, 2005), como a interferência do genótipo na atividade da nitrogenase (Ruschel e Ruschel, 1977), as concentrações endógenas de auxina e a sensibilidade dos tecidos a auxina. Ainda pode-se citar a capacidade dos genótipos de exudar compostos de carbono na rizosfera (Kennedy, 1999; Hartmann et al., 2008), a diversidade destes compostos exudados (Moutia et al., 2010), bem como a capacidade da planta em reabsorvê-los (Benizri et al., 2001). Estas características sugerem mecanismos potenciais para explicar as variações encontradas na população de bactérias e as diferentes respostas dos genótipos à inoculação com PGPB.

Os resultados significativos de interação encontrados para os parâmetros brix e diâmetro indicam que, nessa fase, já é possível identificar e selecionar famílias de cana-de-açúcar mais responsivas a inoculação com PGPB. Estas famílias, que apresentaram altos e baixos valores de interação, poderiam ser usadas em futuros trabalhos com o objetivo de descobrir novos mecanismos envolvidos na associação entre plantas e PGPB, bem como identificar características fenotípicas ou genotípicas que permitam reconhecer plantas que apresentem interação positiva ou negativa com PGPB.

Dessa forma, os resultados aqui observados não apenas apontam para a seleção de famílias e genótipos mais responsivos a fixação biológica, como sugerem que essa seleção pode ser realizada visando à associação ideal entre genótipo e estirpe.

#### 4.5 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente estudo mostram que há uma interação significativa entre *A. brasilense* e várias famílias de cana-de-açúcar. Por isso, em um programa de melhoramento de cana-de-açúcar, visando melhor resposta a inoculação com bactérias diazotróficas recomenda-se a inoculação dos *seedlings* a partir da primeira fase de seleção. Além disso, devido a essa interação, o melhorista precisa escolher com critério a estirpe ou as estirpes com a qual os *seedlings* são inoculados.

#### 4.6 REFERÊNCIAS

- Arzanesh, M.H., Alikhani, H.A., Khavazi, K., Rahimian, H.A. and Miransari, M., 2009. In vitro growth of wheat (*Triticum aestivum* L.) seedlings, inoculated with *Azospirillum* sp., under drought stress. *International Journal of Botany*, 5: 244-249.
- Assmus, B., Hutzler, P., Kirchhof, G., Amann, R., Lawrence, J.R. and Hartmann, A., 1995. *In situ* localization of *Azospirillum brasilense* in the rhizosphere of wheat with fluorescently labeled, rRNA-targeted oligonucleotide probes and scanning confocal laser microscopy. *Applied and Environmental Microbiology*, 61:3:1013–1019. PMC1388383.
- Baldani, I.J. and Baldani, L.V., 2005. History on the biological nitrogen fixation research in graminaceous plants: special emphasis on the Brazilian experience. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 77:549-579. PMID:16127558.
- Bashan, Y. and Bashan, L.E., 2011. How the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum* promotes plant growth: A critical assessment. *Adv. Agron.*, 108: 77-136. DOI: 10.1016/S0065-2113.
- Bashan, Y., Bustillos, J.J., Leyva, L.A., Hernandez, J.P., and Bacilio, M., 2006. Increase in auxiliary photoprotective photosynthetic pigments in wheat seedlings induced by *Azospirillum brasilense*. *Biol. Fertility Soils*, 42: 279–285. DOI:10.1007/s00374-005-0025-x.
- Bashan, Y., Holguin, G. and de-Bashan, L.E., 2004. *Azospirillum*–plant relationships: physiological, molecular, agricultural and environmental advances (1997–2003). *Canadian Journal of Microbiology* 50:521–577. PMID:15467782.
- Bashan, Y. and Holguin, G., 1997. *Azospirillum* plant relationships: environmental and physiological advances (1990-1996). *Canadian Journal of Microbiology*, 43:103-121.
- Bashan, Y. and Levany, H., 1990. Current status of *Azospirillum* inoculation technology: *Azospirillum* as a challenge for agriculture. *Canadian Journal of Microbiology*, 36:591-608.
- Bashan, Y., Harrison, K., and Whitmoyer, R., 1990. Enhanced growth of wheat and soybean plants inoculated with *Azospirillum brasilense* is not necessarily due to general enhancement of mineral uptake. *Applied and Environmental Microbiology*, 56:3:769-775. PMID: 16348150;
- Benizri, E., E. Baudoin and A. Guckert, 2001. Root colonization by inoculated plant growth-promoting rhizobacteria. *Biocontrol Science and Technology*, 11:5:557-574.
- Broek, A.V., Michiels J., van Gool A. and Vanderleyden J., 1993. Spatial-temporal

- colonization patterns of *Azospirillum brasilense* on the wheat root surface and expression of the bacterial *nifH* gene during association. *Mol. Plant-Microbe Interactions*, 6:5:592-600.
- Biari, A., A. Gholami and H.A. Rahmani, 2008. Growth promotion and enhanced nutrient uptake of maize (*Zea mays* L.) by application of plant growth promoting rhizobacteria in arid region of Iran. *Journal of Biological Sciences*, 8: 1015-1020.
- Coelho, C.H.M., A.F.A. Medeiros, J.C. Polidoro, R.P. Xavier, A. Resende et al., 2003. Identification of genotypes of sugar cane with respect to their potential contribution from biological nitrogen fixation. *Agronomia*, 37: 37 – 40.
- Döbereiner, J. and Day, J.M. 1976. Associative symbiosis in tropical grass: Characterization of microorganisms and dinitrogen-fixing sites. *Proceedings of the International Symposium on N<sub>2</sub> Fixation*, Sep 13-17, 1976, Washington State University, p. 518-537.
- Donato, V.M.T.S., de Andrade, A.G., de Souza, E.S., de Franca, J.G.E. and G.A. Maciel, 2004. Enzymatic activity in sugar cane varieties cultivated *in vitro* under nitrogen levels. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 39: 1087-1093. Disponível em: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0100-204X2004001100006](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-204X2004001100006) [Acessado em 22 fevereiro de 2012].
- De Mendonça, M.M., Urquiaga, S.S. and Reis, V.M., 2006. Genotypic variability of maize for nitrogen accumulation and contribution of biological nitrogen fixation. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 41: 1681-1685. Disponível em: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0100-204X2006001100015](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-204X2006001100015) [Acessado em 22 fevereiro de 2012]
- De Oliveira, A.L.M., Canuto, E.L., Urquiaga, S., Reis, V.M. and Baldani, J.I., 2006. Yield of micropropagated sugarcane varieties in different soil types following inoculation with diazotrophic bacteria. *Plant Soil*, 284:23–32. DOI: 10.1007/s11104-006-0025-0.
- De Resende, M.D.V., 2006. O software selegen-Reml/Blup. Resende, M. D. V. (2006) O software Selegen REML/BLUP. Embrapa Informação Tecnológica, Campo Grande
- FAO, 2006. World Reference Base for Soil Resources. Food and Agriculture Organization, Roma, 145p.
- Ferreira, F.M., M.H.P. Barbosa, R.D. Castro, L.A. Peternelli and CD Cruz, 2005. Effects of inbreeding on the selection of sugar cane clones. *Crop Breeding Applied Biotechnology*, 5:174-182.
- Hair, K. and T.R. Srinivasan, 2005. Response of sugarcane varieties to application of nitrogen fixing bacteria under different nitrogen levels. *Sugar Tech*, 7:28-31.
- Hartmann, A., M. Schmid, D. van Tuinen and G. Berg, 2008. Plant-driven selection of

- microbes. *Plant Soil*, 321:235-257. DOI: 10.1007/s11104-008-9814-y.
- Hungria, M.; Campo, R.J.; Souza, E.M.; Pedrosa, F.O., 2010. Inoculation with selected strains of *Azospirillum brasilense* and *A. lipoferum* improves yields of maize and wheat in Brazil. *Plant and Soil*, 331:413–425. DOI: 10.1007/s11104-009-0262-0.
- IAPAR, 1994. *Cartas Climáticas do Estado do Paraná*. Instituto Agronômico do Paraná, Londrina, 49p.
- Keyeo, F., Ai'shah, O.N. and Amir, H.G., 2011. The effects of nitrogen fixation activity and phytohormone production of diazotroph in promoting growth of rice seedlings. *Biotechnology*, 10: 267-273.
- Kennedy, A.C., 1999. Bacterial diversity in agroecosystems. *Agric. Ecosyst. Environ.*, 74: 65-76.
- Koochehzadeh, A., Fathi, G., Gharineh, M.H., Siadat, S.A., Jafari, S. and Alami-Saeid, Kh., 2009. Impacts of rate and split application of n fertilizer on sugarcane quality. *International Journal of Agricultural Research*, 4: 116-123.
- Ladha, J.K., Tirol-Padre, A., Punzalan, G.C., and Watanabe, I., 1987. Nitrogen-fixing (activity and plant growth characters of 16 wetland rice varieties. *Soil Sci. Plant Nutr.*, 32:91-106.
- Lopes, V.R., Bessalho Filho, J.C., Oliveira, R.A., Guerra, E.P., Zambon, J.L.C. and Daros, E., 2008. Genetic divergence and parent selection of sugarcane clones. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, 8:225-231.
- Moutia, J.F.Y., Saumtally, S., Spaepen, S., and Vanderleyden, J., 2010. Plant growth promotion by *Azospirillum* sp. in sugarcane is influenced by genotype and drought stress. *Plant Soil*, 337:233–242. DOI: 10.1007/s11104-010-0519-7.
- Munir, A., Munir, I., Afrasyab, S. and Hasnain, S., 2003. Growth stimulatory effects of *Azospirillum* strains on *Triticum aestivum* and *Vigna radiata*. *Biotechnology*, 2: 198-205.
- Muños-Rojas, J. and Caballero-Mellado, J., 2003 Population dynamics of *Gluconacetobacter diazotrophicus* in sugarcane cultivars and effect on plant grow. *Microbiol. Ecol.*, 45:454-464. DOI: 10.1007/s00248-003-0110-3.
- Nogueira, E. de M., Olivares, F.L., Japiassu, J.C., Vilar, C., Vinagre, F., Baldani, J.I. and Hemerly, A.S., 2005. Characterization of glutamine synthetase genes in sugarcane genotypes with different rates of biological nitrogen fixation. *Plant Sci.*, v.169, p. 819–832.
- Olivares, F.L., James, E.K., Baldani, J.I. and Döbereiner, J., 1997. Infection of mottled stripe disease-susceptible and resistant sugar cane varieties by the endophytic diazotrophic *Herbaspirillum*. *New Phytol.*, 135:723-737. DOI: 10.1046/j.1469-8137.1997.00684.x.

- Oliveira, A.L.M., Stoffels, M., Schmid, M., Reis, V.M., Baldani, J.I. and Hartmann, A., 2009. Colonization of sugarcane plantlets by mixed inoculations with diazotrophic bacteria. *Eur. J. Soil Biol.*, 45:106–113. DOI:10.1016/j.ejsobi.2008.09.004.
- Oliveira, A.L.M., Urquiaga, S., Döbereiner J. and J.I. Baldani, 2002. The effect of inoculating endophytic N<sub>2</sub>-fixing bacteria on micropropagated sugarcane plants. *Plant and Soil*, 242: 205–215. DOI: 10.1023/A:1016249704336.
- Ovando-Medina, I., Adriano-Anaya, L., Chavez-Aguilar, A., and Oliva-Llaven, A., 2007. Ex vitro survival and early growth of *Alpinia purpurata* plantlets inoculated with *Azotobacter* and *Azospirillum*. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 10: 3454-3457.
- Papini-Terzi, F.S., Rocha, F.R., Vencio, R.Z.N., Felix, J.M. and Branco, D.S., 2009. Sugarcane genes associated with sucrose content. *BMC Genomics*, 10:3940 p.
- Pedrinho, E.A.N., Galdiano Jr., R.F., Campanharo, J.C., Alves, L.M.C., and Lemos, E.G.M., 2010. Identification and evaluation of bacteria isolated from roots of maize. *Bragantia*, 69: 905-912.
- Ruschel, A.P. and Ruschel, R., 1977. Varietal differences affecting nitrogenase activity in rizosphere of sugar cane. *Proc. Int. Soc. Sugar Cane Technol.*, 2:1941-1947.
- Sala, V.M.R., Cardoso, E.J.B.N., De Freitas, J.G. and Da Silveira, A.P.D., 2007. Wheat genotypes response to inoculation of diazotrophic bacteria in field conditions. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 42: 833-842.
- Shaukat, K., Affrasayab, S. and S. Hasnain, 2006. Growth responses of *Triticum aestivum* to plant growth promoting rhizobacteria used as a biofertilizer. *Research Journal of Microbiology*, 1: 330-338.
- Schlöter, M. and Hartmann, A., 1998. Endophytic and surface colonization of wheat roots (*Triticum aestivum*) by different *Azospirillum brasilense* strains studied with strain-specific monoclonal antibodies. *Symbiosis*, 25: 159-179.
- Tarrand, J.J., Krieg, N.R. and Döbereiner, J., 1978. A taxonomic study of the *Spirillum lipoferum* group, with descriptions of a new genus, *Azospirillum* gen. nov. and two species, *Azospirillum lipoferum* (Beijerinck) comb. nov. and *Azospirillum brasilense* sp. nov. *Canadian J. Microbiol.*, 24:967-980. DOI: 10.1139/m78-160.
- Urquiaga, S., Cruz, K.H.S. and Boddey, R.M., 1992. Contribution of nitrogen fixation to sugar cane: Nitrogen 15 and nitrogen balance estimates. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 56:105-114.
- Verma, J.P., Yadav, J., Tiwari, K.N., Lavakush and Singh, V., 2010. Impact of plant growth promoting rhizobacteria on crop production. *International Journal of Agricultural Research*, 5: 954-983.

Vinagre, F., Vargas, C., Schwarcz, K., Cavalcante, J., and Nogueira, E.M., 2006. SHR5: A novel plant receptor kinase involved in plant-N<sub>2</sub>-fixing endophytic bacteria association. *J. Exp. Bot.*, v. 57, n. 3, p. 559–569. DOI: 10.1093/jxb/erj041.

Zaied, K.A., Abd El-Hady, A.H., Aida Afify, H. and Nassef, M.A., 2003. Yield and nitrogen assimilation of winter wheat inoculated with new recombinant inoculants of rhizobacteria. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 6:344-358.

Wolff, W.M. and Floss, E.L., 2004. Correlation among nitrogen and chlorophyll contents of leaves and grain yield of oat. *Ciência Rural*, Santa Maria, 38: 1510-1515. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/cr/v38n6/a03v38n6.pdf> [Acessado em 20 de novembro de 2011]

## CAPÍTULO II - INTERAÇÃO DE FAMÍLIAS DE CANA-DE-AÇÚCAR COM DOIS INOCULANTES A BASE DE BACTÉRIAS PROMOTORAS DO CRESCIMENTO VEGETAL EM CANA-PLANTA E CANA-SOCA.<sup>4</sup>

### RESUMO

A resposta de famílias de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) a inoculação com bactérias promotoras do crescimento vegetal (PGPB) pode apresentar valores positivos e negativos de interação, dependendo do caractere em estudo, família usada e tipo de inoculante, o que indica a possibilidade de selecionar genótipos responsivos à associação. Entretanto o estudo da repetibilidade dos resultados, usando mais de um ciclo da cultura, é essencial para compreender melhor o comportamento das plantas e a associação. Com base nesses preceitos o presente estudo objetivou avaliar a repetibilidade da resposta de 27 famílias de cana-de-açúcar tratadas com dois diferentes inoculantes a base de PGPB em dois ciclos, cana-planta e cana-soca. As famílias provenientes de cruzamentos entre clones de cana-de-açúcar receberam três diferentes tratamentos, quatro meses após a germinação: (T0) não inoculadas; (T1) inoculadas com Triazo (composto pelas estirpes Abv5, Abv6 e Abv7 de *Azospirillum brasilense*); (T2) inoculadas com um mix contendo cinco diferentes espécies de PGPB (*Gluconacetobacter diazotrophicus* Pal5, *Azospirillum amazonense* CBAmC, *Burkholderia tropica* Ppe8, *Herbaspirillum rubrisubalbicans* HCc103 e *Herbaspirillum seropedicae* HRC54). Foram realizadas avaliações em cana-planta e cana-soca, usando-se como parâmetros caracteres de produtividade. O valor médio da correlação entre os dois ciclos foi de 0,63. Observaram-se diferentes respostas entre as safras para algumas famílias, mostrando que outros fatores também influenciam na associação. Os caracteres brix e diâmetro do colmo foram os que mais contribuíram para as diferenças encontradas. Também se verificou diferença entre os inoculantes utilizados, indicando que a escolha do inoculante mais adequado às condições da região pode levar a diferentes respostas.

**Palavras-chave:** PGPB, melhoramento genético de cana-de-açúcar, interação planta-bactéria, bactérias fixadoras de nitrogênio.

### ABSTRACT

The response of sugarcane (*Saccharum* spp.) families to inoculation with plant growth promoting bacteria (PGPB) can show positive and negative interaction values depending on the character studied, family used and inoculants. This result indicates the possibility to select genotypes that present response to association. However the study of the repeatability of results, using more than one cycle, is essential to understand the plants behavior and the plant-bacteria association. Based on these precepts this study aimed to evaluate the repeatability of the response of the 27 sugarcane families treated with two different inoculants made of the

---

<sup>4</sup> Este capítulo refere-se ao Experimento 2

PGPB, in two sugarcane cycles, first and second ratoon. Four months after germination, 27 families from crosses between clones of sugarcane were treated with: (T0) no inoculated; (T1) inoculated with Triazo, which was composed of a mixture of the Abv5, Abv6 and Abv7 strains of *Azospirillum brasilense* or; (T2) with the inoculant named mix that contained five strains of PGPB (*Gluconacetobacter diazotrophicus* Pal5, *Azospirillum amazonense* CBAmC, *Burkholderia tropica* Ppe8, *Herbaspirillum rubrisubalbicans* HCc103 and *Herbaspirillum seropedicae* HRC54). These plants were assessed on first and second ratoon on the basis of various productivity parameters. The correlation values between the two cycles were 0.63. Different responses between the cycles were observed for some families, showing that there are other factors that also influence the association. The characters brix and stalk diameter were the main contributors of the differences observed. The inoculants also presented influence on the results, indicating that the choice of the more appropriated inoculant to the cultivation region may lead to different response.

**Keywords:** PGPB, sugarcane breeding, plant-bacteria interaction, nitrogen fixing bacteria,

## 5.1 INTRODUÇÃO

A cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) possui grande importância econômica, social e ambiental no Brasil, sendo a terceira cultura agrícola mais plantada no país (IBGE, 2012). Entretanto, os gastos com adubos nitrogenados, necessários em grande quantidade para Poaceas como a cana-de-açúcar, e os problemas que esse tipo de fertilizante tem gerado ao meio ambiente, levam à busca por alternativas mais baratas e mais sustentáveis.

No Brasil, ao longo de anos de pesquisa, verificou-se que plantas de cana-de-açúcar mantinham seus índices de produtividade sem sintomas de deficiência nutricional mesmo quando não fertilizadas com nitrogênio (URQUIAGA et al., 2005), fator esse que foi atribuído à presença de bactérias fixadoras de nitrogênio associativas. Estudos posteriores identificaram diferentes gêneros de bactérias associadas à cultura da cana-de-açúcar, que seriam as responsáveis pela fixação biológica de nitrogênio (FBN). Os principais gêneros isolados foram *Gluconacetobacter*, *Herbaspirillum*, *Azospirillum*, *Burkholderia*, *Beijerinckia* e *Azotobacter* (BALDANI e BALDANI, 2005), desde então, estudos tem focado na identificação de espécies e estirpes mais eficientes em fixar nitrogênio e associar-se a cana-de-açúcar. Porém, os estudos mostraram existir uma interação genótipo-bactéria, que é responsável pelos diferentes resultados quanto à eficiência em fixar nitrogênio, demonstrando a importância do genótipo vegetal no sucesso dessa interação (MUÑOS-ROJAS e CABALLERO-MELLADO, 2003; OLIVEIRA et al., 2006).

Alguns trabalhos evidenciaram a diferença na resposta à FBN dependendo da cultivar de cana-de-açúcar estudada (COELHO et al., 2003; HARI e SRINIVASAN, 2005), sugerindo que o melhoramento genético da planta poderia auxiliar no aumento da eficiência da FBN.



Nesse sentido, Alcantara et al. (2009) em uma revisão sobre o melhoramento da soja e feijão para a otimização da interação rizóbio-leguminosa, enfatizaram a complexidade desta interação e a necessidade de realizar trabalhos também priorizando o macrossimbionte (soja e feijão), e que isso seria essencial para o sucesso nos programas de melhoramento visando maior FBN. A seleção de cultivares de soja em solos com baixos níveis de nitrogênio, sem fertilização e com a inoculação de estirpes de *Bradyrhizobium* selecionadas em solos brasileiros, foram essências para aumentar a eficiência da FBN (ALVES et al., 2003).

Em cana-de-açúcar, a necessidade de selecionar também o genótipo vegetal torna-se ainda mais importante, pois o fato das bactérias serem associativas e não simbiotes (MARIN et al., 1999) torna a eficiência deste processo muito menor, indicando que a combinação ideal pode resultar em ganhos mais significativos.

Em um estudo com 54 famílias de cana-de-açúcar, Lopes et al. (2012) observaram diferença significativa na resposta das famílias ao tratamento com dois inoculantes a base de *A. brasilense*. Entretanto, estes autores realizaram apenas uma avaliação (cana-planta) e utilizaram um inoculante com bactérias endofíticas facultativas, não específico para cana-de-açúcar, indicando que mais estudos precisariam ser realizados para confirmar os resultados obtidos.

Bactérias endofíticas apresentam vantagens em relação às rizosféricas, devido ao fato da enzima nitrogenase estar mais protegida da ação do nitrogênio no interior dos tecidos, em relação às regiões da rizosfera (MARIN et al., 1999; MOREIRA e SIQUEIRA, 2006) sendo mais eficientes na FBN. O gênero *Azospirillum* tem sido pouco estudado em cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.), sendo utilizado amplamente e com sucesso em outras Poaceas como trigo (*Triticum aestivum*), sorgo (*Sorghum bicolor*), milho (*Zea mays*), festuca (*Festuca arundinacea*) e setária (*Setaria italic*) (BASHAN e DUBROVSKI, 1996), mesmo assim, Lopes et al. (2012) obtiveram bons resultados na promoção do crescimento de famílias de cana-de-açúcar.

Diante do exposto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a resposta de 27 famílias de cana-de-açúcar tratadas com dois diferentes inoculantes à base de bactérias fixadoras de nitrogênio e promotoras do crescimento vegetal, e a repetibilidade dos resultados em dois ciclos de cultivo, cana-planta e cana-soca.

## 5.2 MATERIAL E MÉTODOS

### 5.2.1 Local de instalação do experimento

O experimento foi conduzido na Estação Experimental de Paranavaí da Universidade Federal do Paraná, no município de Paranavaí/PR (23°05'S, 52°27'W, altitude de 503 m), nos anos de 2009 e 2010. O clima da região, de acordo com classificação de Köppen, é o Cfa, clima Subtropical Úmido (Mesotérmico), com temperatura média do mês mais quente superior a 22° C e no mês mais frio inferior a 18° C, sem estação seca definida, verão quente e geadas pouco frequentes (IAPAR, 1994).

O solo da área experimental é classificado no Brasil como Latossolo Vermelho Escuro Distrófico (EMBRAPA, 1999).

### 5.2.2 Material vegetal

Foram utilizadas sementes (cariopses) da série 2009, provenientes de 27 cruzamentos biparentais entre clones de cana-de-açúcar realizados na Estação de Cruzamento da Serra do Ouro (Tabela 1). As sementes foram germinadas em casa de vegetação com irrigação constante, em bandejas plásticas contendo como substrato Plantmax®, em novembro de 2009.

As plântulas (*seedlings*) foram transplantadas para bandejas de isopor com células individuais (60 cm<sup>3</sup>) quarenta dias após a semeadura, permanecendo em telado (50%) até o momento do plantio. Quatro meses após a semeadura as plantas foram tratadas com dois inoculantes a base de estirpes de bactérias promotoras de crescimento vegetal (PGPB), permanecendo em telado (50%) por mais sete dias, seguindo-se então o plantio em campo (dando início a primeira fase do programa de melhoramento de cana-de-açúcar).

Tabela 1: Relação das 27 famílias de cana-de-açúcar da série 2009 utilizadas e cruzamento de origem.

Família	Cruzamento	Família	Cruzamento	Família	Cruzamento
1	RB99361 X RB98710	10	RB971755 X RB987933	19	RB975932 X RB912695
2	RB931565 X RB72454	11	RB936095 X RB965920	20	RB855536 X RB966924
3	RB9557 X RB946022	12	SP80-185 X RB966291	21	RB951541 X RB867515
4	RB965911 X RB93509	13	RB965517 X LAICA01606	22	RB845197 X RB931611
5	RB936109 X RB855595	14	RB981801 X RB91514	23	UFPR4 X RB965911
6	RB931011 X RB961003	15	RB855546 X RB91514	24	RB965517 X RB991555
7	RB931011 X RB9629	16	RB951514 X RB845197	25	RB971537 X RB991555
8	RB855036 X RB951539	17	RB845197 X RB991534	26	RB845210 X RB941537
9	RB966229 X RB92579	18	IAC93-6033 X RB83102	27	RB936001 X RB867515

### 5.2.3 Inoculantes utilizados

Foram utilizados dois inoculantes: um composto por três estirpes de *A. brasilense* (Abv5, Abv6, Abv7) denominado Triazo; e outro composto por um mix de cinco espécies de PGPB (*A. amazonense*, *Herbaspirillum seropedicae*, *Herbaspirillum rubrisubalbicans*, *Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Burkholderia tropica*) fornecido pelo Centro Nacional de Pesquisa em Agrobiologia da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), com sede em Seropédica, Rio de Janeiro, denominado aqui como “mix”.

O inoculante Triazo foi fornecido pela UFPR - Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Curitiba, Paraná. As estirpes Abv5, Abv6 e Abv7 foram isoladas de milho (HUNGRIA et al., 2010), sendo que as estirpes Abv5 e Abv6 apresentaram capacidade de produzir ácido indol acético (AIA) e reduzir acetileno em etileno *in vitro* (PEDRINHO et al., 2010).

O mix de cinco bactérias foi fornecido pela Embrapa Agrobiologia, Seropédica, Rio de Janeiro, e foi desenvolvido com base em estudos comparativos, onde foram utilizadas diferentes combinações de inoculantes a base de PGPB em plantas de cana-de-açúcar. A melhor combinação foi posteriormente utilizada no desenvolvimento deste inoculante que contém as seguintes estirpes: *G. diazotrophicus*, estirpe BR 11281 (PAL 5); *H. seropedicae*, estirpe BR 11335 (HRC54); *H. rubrisubalbicans*, estirpe BR 11504 (HCC103); *A. amazonense*, estirpe BR 11115 (CBAmC); e *B. tropica*, estirpe BR 11366 (Ppe8) (OLIVEIRA et al., 2009).

O inoculante Triazo foi preparado de acordo com metodologia descrita anteriormente (LOPES et al., 2012) e usado na forma líquida, e o mix foi preparado de acordo com metodologia descrita por Oliveira et al. (2009) e usado na forma de turfa, porém dissolvido em água, para cana-planta e líquido em cana-soca.

### 5.2.4 Inoculação

#### 5.2.4.1 Inoculação em cana-planta

As plantas de cada família foram tratadas da seguinte forma: plantas não inoculadas

(Controle – T0); plantas inoculadas com Triazo ( $1 \times 10^9$  bactérias.ml<sup>-1</sup>) (T1); plantas inoculadas com o mix ( $1 \times 10^9$  bactérias.ml<sup>-1</sup>) (T2).

A inoculação foi realizada nas plantas quando estas ainda estavam na bandeja de isopor, quatro meses após a semeadura. Foram aplicados 100 µl do inoculante Triazo, e 1 ml do mix nas concentrações acima mencionadas, na base do colo de cada plântula utilizando-se micropipeta, de acordo com o inoculante utilizado. A maior quantidade do mix (1 ml) foi devido ao fato desse ser fornecido na forma de turfa, precisando ser mais diluído para poder ser aplicado, ao contrário do Triazo que foi usado na forma líquida.

#### 5.2.4.2 Inoculação em cana-soca

Após a avaliação em cana-planta, seguiu-se o corte das plantas, sendo realizada nova inoculação no sulco de plantio (base das plantas), sendo que cada linha recebeu o inoculante de acordo com o tratamento utilizado.

Os inoculantes foram diluídos em água, mantendo-se o pH próximo ao ideal (6,8) para evitar a morte das células, e então pulverizados na linha, na base dos perfilhos, sendo usado um volume de 250 l de calda por hectare. A concentração final dos inoculantes foi aproximadamente  $1 \times 10^9$  bactérias por ml.

Amostras de cada inoculante foram retiradas após a diluição para verificar a viabilidade das células e garantir a eficiência da aplicação. Para cada inoculante foi utilizado meio específico de inoculação de acordo com metodologia de Döbereiner (1995), sendo que houve crescimento nas diluições seriadas indicando a viabilidade das células bacterianas no momento da aplicação.

#### 5.2.5 Delineamento experimental

O delineamento experimental foi de blocos completos com parcelas subdivididas, com três repetições. Cada bloco foi composto por 27 parcelas, sendo que cada família foi representada por uma parcela. Cada parcela foi composta por três linhas de 5 m de comprimento contendo 10 plantas cada e por sua vez, cada linha representou um tratamento (T0, T1 e T2 – subparcela). O espaçamento utilizado foi o de 1,40 m entre linhas e 0,50 m entre plantas, com uma área total de 2000 m<sup>2</sup>. Como bordadura foram utilizadas plantas de

cana-de-açúcar provenientes de cruzamentos de polinização livre.

O plantio foi realizado em fevereiro de 2010. A adubação foi realizada na linha de plantio, sendo que cada linha de 5 m recebeu 540 g de cloreto de potássio e 180 g de superfostato simples, sem adição de adubo nitrogenado. O manejo seguiu o padrão para a cultura da cana-de-açúcar, com aplicação de herbicida pré-emergência, capinas pós-emergência e sem irrigação.

Após a avaliação em cana-plantia seguiu-se o corte e adubação, com posterior inoculação. O manejo também seguiu o padrão conforme mencionado acima, até a última avaliação em cana-soca.

#### 5.2.6 Avaliações

As avaliações foram realizadas em cana-plantia (2011) e cana-soca (2012), quando as plantas apresentavam aproximadamente 12 meses e os parâmetros estimados foram: número de colmos por parcela, estatura da planta (em metros, a partir da primeira folha com o *dewlap* visível até a base do colmo), diâmetro dos colmos (em centímetros, no terceiro entrenó a partir da base) e brix (medido com refratômetro de campo).

#### 5.2.7 Análise estatística

Os dados de todos os parâmetros foram analisados usando o software Selegen REML/BLUP (DE RESENDE, 2006), para determinar a diferença significativa entre as famílias, tratamentos e suas interações. O software estima os componentes de variância e predição de valores genéticos pelo procedimento de melhor predição linear não tendencioso-máxima verossimilhança restrita (REML/BLUP). O modelo estatístico usado segue abaixo:

$$y = Xa + Zb + Wp + Qr + T(axb) + e,$$

Onde  $y$  é o vetor de dados,  $a$  é o vetor do efeito do fator A (assumido como fixo, alocados na parcela) adicionados à média geral,  $b$  é o vetor de efeito genotípico associado à sub-parcela (nível do fator B dentro do fator A, assumido como aleatório),  $p$  é o vetor dos efeitos de parcelas ou do erro associados à interação do fator A com o fator repetições (assumidos como aleatórios),  $r$  é o vetor dos efeitos de blocos ou repetições (assumidos como aleatórios),  $a \times b$  é vetor dos efeitos da interação genótipo x fator A (aleatórios), e  $e$  é o vetor

de erros ou resíduos (aleatórios). As letras maiúsculas representam as matrizes de incidência para os referidos efeitos (DE RESENDE, 2006).

Para a correlação entre as duas safras foi utilizado o programa *Excel*, para o cálculo da correlação simples entre dois fatores.

### 5.3 RESULTADOS

Os resultados obtidos pela Análise de Deviance (ANADEV), tanto para cana-planta quanto para cana-soca encontram-se na Tabela 2.

Os resultados nas duas safras mostraram-se próximos para todos os caracteres e efeitos analisados.

**Tabela 2:** Resultados da Análise de Deviance para os caracteres: número de colmos por touceira (NC), estatura da planta (EST), diâmetro do colmo (DIA) e brix, das 27 famílias de cana-de-açúcar, em cana-planta e cana-soca, de acordo com o tratamento usado.

Efeitos	Valores de $X^2$							
	NCT		EST		DIA		brix	
	Planta	Soca	Planta	Soca	Planta	Soca	Planta	Soca
Família (F)	17,10 ***	20,88***	9,35 ***	22,34***	5,89**	9,81 ***	12,48***	17,47 ***
Trat. (T)	0,02 ns	0,00 ns	88,00***	3,28*	164,23***	19,16 ***	36,98***	22,43 ***
Bloco	0,18 ns	2,89ns	35,38***	7,48***	35,02***	6,23 **	12,24***	25,83 ***
Interação F x T	0 ns	0,26ns	0,01 ns	1,22 ns	1,58 ns	2,05 ns	6,17**	18,63 ***
<b>CV%</b>	18,99	19,57	10,17	6,13	11,69	6,45	4,97	3,97
<b>Acurácia (rgloc)</b>	0,99	0,94	0,98	0,90	0,92	0,84	0,79	0,71

\*\*\* significativo a 1%, \*\* significativo a 5%, \* significativo a 10% e <sup>ns</sup> e não significativo

A variável número de colmos por touceira apresentou significância apenas para o efeito família em ambas as avaliações (cana-planta e cana-soca). Para estatura e diâmetro do colmo verificou-se efeito significativo apenas para a família, tratamento e bloco, indicando que para estes caracteres a interação não foi significativa. Já o caractere brix, apresentou diferença significativa para todos os efeitos, incluindo a interação (família x tratamento).

O resultado significativo para o efeito família é esperado nesta fase do melhoramento genético, onde ainda não foi realizada seleção e as plantas são provenientes de cruzamento, ou seja, a população normalmente apresenta uma alta variabilidade genética, mesmo para caracteres qualitativos.

**Tabela 3:** Média dos caracteres avaliados nas 27 famílias de cana-de-açúcar de acordo com os inoculantes usados, em cana-planta e cana-soca.

Tratamento	Média da variável					
	Estatura (m)		Diâmetro (cm)		brix	
	Planta***	Soca*	Planta***	Soca***	Planta***	Soca***
Controle	2,0151	1,6023	2,0606	2,2524	18,0901	19,4741
Triazo	2,0234	1,6104	2,0793	2,2369	17,9237	19,2140
Mix	2,0089	1,5701	2,0772	2,2419	18,0870	19,3415

\*\*\* significativo a 1%, \* significativo a 10% e ns e não significativo

A média das variáveis que apresentaram diferença significativa para o efeito tratamento, tanto para cana-planta quanto para cana-soca, é apresentada na Tabela 3.

O efeito do tratamento para a estatura da plantas foi significativo, e mostrou que plantas tratadas com o inoculante Triazo apresentaram maior estatura (2,0234 e 1,6104 m) em relação a plantas não tratadas, sendo que plantas inoculadas com o mix tiveram resultado inferior (2,0089 e 1,5701 m) ao do controle (2,0151 e 1,6023 m) em ambas avaliações, cana-planta e cana-soca, respectivamente (Tabela 3).

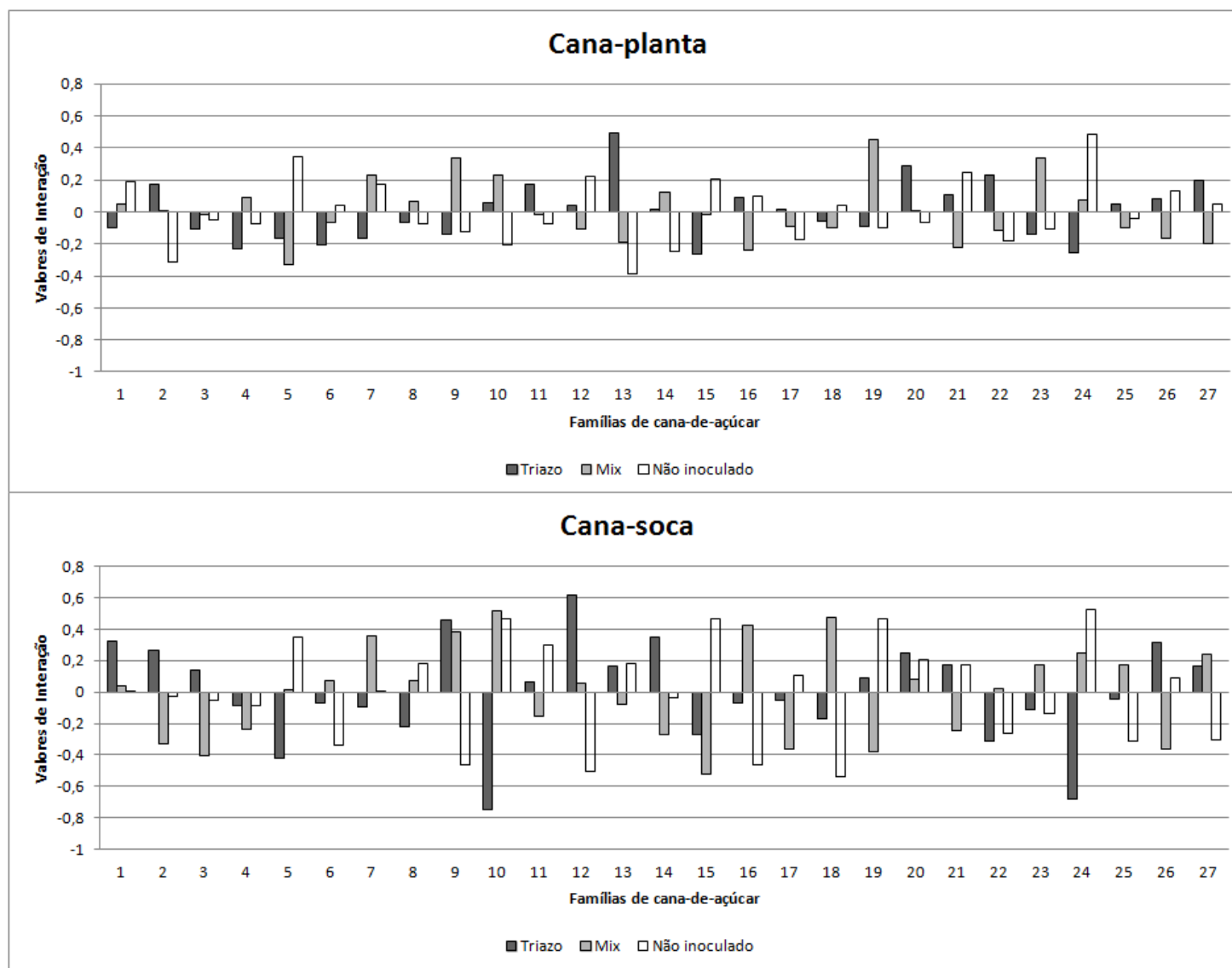
O mesmo resultado foi encontrado para o diâmetro do colmo, em que foi observada a superioridade do controle (2,0606 cm e 2,2524 cm) em relação aos tratamentos, mix (2,0772 e 2,2419) e Triazo (2,0793 e 2,2369).

O caractere brix também foi afetado pelos diferentes tratamentos sendo que o controle apresentou valores superiores (18,0901 e 19,4741) em relação às plantas inoculadas tanto com o mix (18,0870 e 19,3415) quanto com o Triazo (17,9237 e 19,2140).

Os resultados para a interação família x tratamento para ambas as safras, são apresentados na Figura 1. Como pode ser observado, os valores de interação variaram de acordo com a família e tratamento, bem como diferiram entre cana-planta e cana-soca.

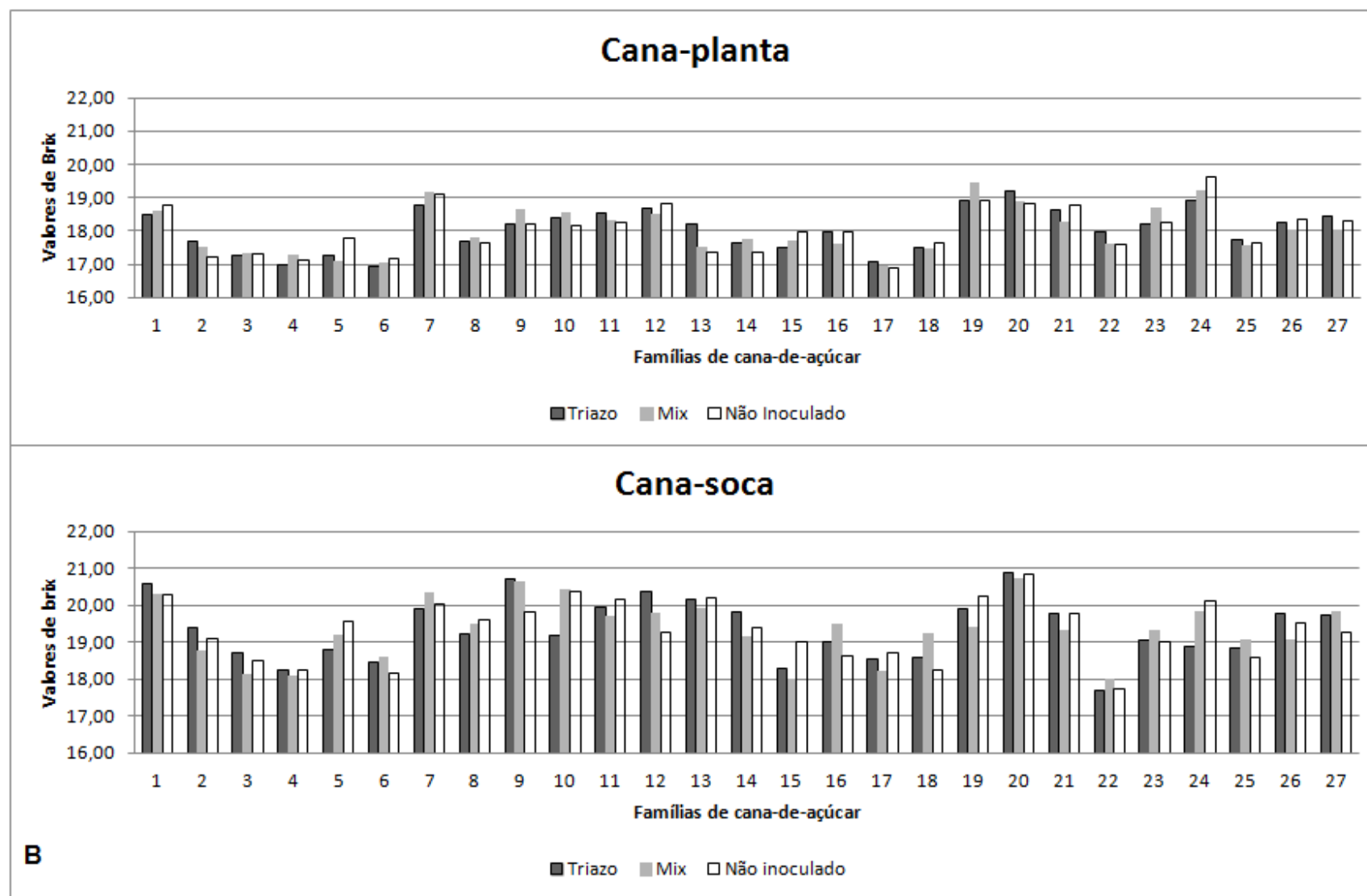
Os maiores valores de interação entre família e inoculante para o caractere brix em cana-planta, foram observados para as famílias 19 (0,4503), 9 (0,3364) e 23 (0,3351) quando inoculadas com o mix e as famílias 13 (0,4954), 20 (0,2841) e 22 (0,2300) quando inoculadas com triazo. Esses valores positivos indicam que essas famílias podem ser interessantes para a seleção de clones de cana-de-açúcar visando à interação positiva.

Os maiores valores negativos de interação foram observados nas famílias 4 (-0,2289), 24 (-0,2582) e 15 (-0,2608) quando inoculada com Triazo e nas famílias 5 (-0,3281), 16 (-0,2368) e 21 (-0,2245) quando inoculadas com o mix, indicando que estas famílias podem não ser interessantes para a seleção visando a interação com esses inoculantes.



**Figura 1:** Valores de Interação família x tratamento para o caractere brix, de 27 famílias de cana-de-açúcar em relação aos três tratamentos utilizados (não inoculado, inoculado com Triazo e inoculado com IC26), em duas épocas de avaliação, cana-planta e cana-soca.





**Figura 2:** Valores de médios de brix de 27 famílias de cana-de-açúcar em relação aos três tratamentos utilizados, em duas épocas de avaliação, cana-planta e cana-soca.

Em cana-soca, as famílias 10 (0,5137), 18 (0,4718) e 16 (0,4273) apresentaram os maiores valores de interação quando inoculados com o mix, enquanto as famílias 12 (0,6185), 9 (0,4564) e 14 (0,3486) quando inoculados com o Triazo. Já as famílias 10 (-0,7503), 24 (-0,6832) e 5 (-0,4252) apresentaram valores mais negativos quando inoculadas com Triazo, enquanto as famílias 15 (-0,5221), 3 (-0,4077) e 19 (-0,3822) quando inoculadas com o mix (Figura 1).

As famílias 2, 5, 7, 13, 15, 21, 23, 24 e 26 apresentaram o mesmo comportamento para interação família x tratamento, tanto em cana-planta quanto em cana-soca, embora a magnitude dos valores tenha sido diferente, indicando a repetibilidade na resposta dessas famílias (Figura 1).

Na figura 2 são apresentados os valores de brix para cada família de acordo com os diferentes tratamentos, em cana-planta e cana-soca. Como pode ser observado os valores diferiram de acordo com o tratamento usado, indicando o efeito da interação família x inoculante (tratamento).

Verificou-se que, de forma geral, os valores de brix em cana-planta foram inferiores aos observados em cana-soca. Algumas famílias apresentaram resultados superiores de brix quando tratadas com inoculante em comparação àquelas não tratadas, como as famílias 2, 4, 9, 10, 11, 13, 19, 20, 22, 23, 25 e 27 em cana-planta e as famílias 1,2, 3, 6, 7, 9, 12, 14, 16, 18, 22, 23, 26 e 27 em cana-soca. Já as famílias 1, 5, 12, 15 e 24 apresentaram maiores valores de brix em cana-planta quando não inoculadas, e em cana-soca o mesmo resultado foi observado para as famílias 5, 8, 11, 13, 15, 17, 19 e 24 (Figura 2).

## 5.4 DISCUSSÃO

Os valores de Qui-quadrado ( $X^2$ ) apresentaram-se semelhantes para ambas as avaliações, em cana-planta e cana-soca, informação esta que foi confirmada pela correlação para o caractere brix, entre as duas colheitas, que foi de 0,68 (considerado significativo a 1% de probabilidade), demonstrando a repetibilidade dos resultados. Estas informações se assemelham àquelas observados por Pedrozo et al. (2012), que comparando os valores de TCH e TBH de famílias de cana-de-açúcar, entre duas safras, verificou repetibilidade dos resultados (0,69 e 0,65, respectivamente), embora o valor encontrado por esses autores para o caractere brix tenha sido menor (0,38). Para esses autores, a repetibilidade entre safras é realizada baseando-se no genótipo (individual), porém o conhecimento da repetibilidade das

famílias também pode ajudar a reduzir tempo e custos no melhoramento. O valor encontrado no presente estudo também pode indicar que a seleção pode ser eficiente ainda em estádios iniciais, pois há repetibilidade dos resultados obtidos.

Em relação ao efeito dos tratamentos utilizados, verificou-se significância para estatura, diâmetro do colmo e brix, resultado este que concorda com os obtidos por Lopes et al. (2012), que obtiveram valores significativos para estes caracteres quando compararam famílias de cana-de-açúcar inoculadas e não inoculadas com Triazo. Estes autores observaram que plantas tratadas com Triazo apresentavam maior estatura e diâmetro de colmo em relação a plantas não tratadas, e que plantas não inoculadas apresentavam maior valor de brix em relação a plantas tratadas com Triazo, concordando com os resultados obtidos no presente estudo.

Os maiores valores, para a estatura e diâmetro de colmo, encontrados em plantas inoculadas com o mix, podem estar relacionados ao efeito dessas bactérias na promoção do crescimento vegetal. As bactérias que compõem o mix já demonstraram esse efeito em diferentes experimentos, sozinhas ou combinadas, sendo as bactérias mais indicadas para o uso na cultura da cana-de-açúcar, uma vez que foram isoladas de colmos e raízes de cultivares e híbridos da própria cana-de-açúcar (OLIVEIRA et al., 2009). Porém, como pode ser observado pelas médias, os resultados do inoculante composto por estirpes de *A. brasilense* (Triazo) apresentou melhores resultados para estes caracteres em relação ao mix (Tabela 3).

Vale ressaltar que as pesquisas para seleção das bactérias que compõem o mix tiveram como primeiro objetivo a FBN (BALDANI e BALDANI, 2005), sendo que os efeitos na promoção do crescimento tornaram-se um fator positivo e desejável apenas recentemente. Nesse caso, as bactérias do mix podem ser tidas como mais eficiente na FBN, uma vez que são endofíticas e possuem melhor eficiência da nitrogenase, em relação às facultativas (*A. brasilense*) (BASHAN e DUBROVSKI, 1996; MOUTIA et al., 2010).

Por outro lado, a espécie *A. brasilense* é amplamente conhecida por suas características na promoção do crescimento vegetal através de diferentes mecanismos (BASHAN e BASHAN, 2011; TORTORA et al., 2011), sendo encontradas em uma diversidade de espécies vegetais e associadas a diferentes tipos de organismos (BASHAN e BASHAN, 2011). Embora alguns autores afirmem que, em relação ao nitrogênio, a quantidade fixada por esta bactéria seja suficiente apenas para o seu próprio consumo, é a espécie que apresenta maiores respostas na promoção do crescimento (BASHAN e BASHAN, 2011; MOUTIA et al., 2011).

Em relação ao caractere brix, os resultados observados são semelhantes àqueles

observados por Pereira (2011), onde o valor de brix da cultivar RB72454 apresentou redução em plantas inoculadas com o mix (18,05) em relação às aquelas não inoculadas (19,4). Este autor atribuiu este resultado ao aumento da produção de colmos, resultando em menor acúmulo de sacarose nos colmos, o que também poderia explicar os resultados observados no presente estudo, onde plantas inoculadas com Triazo apresentaram maior estatura e menores valores de brix. Porém, no caso do mix, os valores obtidos no presente estudo, para todos os parâmetros avaliados foram inferiores ao controle (não inoculada), mostrando que esta resposta não foi a mesma quando utilizou-se esse inoculante.

A resposta à inoculação com PGPB, ou a sua eficiência, está relacionada a outros fatores ambientais como tipo de solo, fertilidade, umidade, presença de outros microrganismos e matéria orgânica (MOREIRA e SIQUEIRA, 2006). Esta característica permite que a diversidade da população de microrganismos nativos seja diferente em cada região (CABALLERO-MELLADO e MARTINEZ-ROMERO, 1994; TEJERA et al., 2005).

Em um trabalho realizado no Estado do Paraná, Magnani et al. (2010) não conseguiram isolar bactérias dos gêneros *Glucanacetobacter*, *Herbaspirillum*, *Burkholderia* e *Azospirillum* de folhas e colmos de cana-de-açúcar. Embora estes autores tenham atribuído parte do resultado ao fato do meio de cultura utilizado ser muito específico (LGI), isto mostra que as condições ambientais do presente estudo podem não ter favorecido o desenvolvimento e estabelecimento das bactérias que compõem o mix. As bactérias do mix foram isoladas de regiões com condições ambientais diferentes (Estado do Rio de Janeiro) daquelas da região de Paranaíba, onde foi realizado o presente experimento, o que poderia justificar o menor desempenho deste inoculante.

No caso do inoculante Triazo, embora as bactérias que o compõem tenham sido isoladas de raízes de milho, as mesmas foram isoladas/coletadas no Estado do Paraná (HUNGRIA, 2010), ou seja, em uma região mais próxima daquela onde foi realizado o presente estudo, e com características ambientais diferentes daquelas de onde foram isoladas as bactérias que compõem o mix.

Corroborando com estes resultados, Roesch et al. (2007), coletando amostras de milho de diferentes regiões no Rio Grande do Sul, encontraram uma grande diversidade de bactérias endofíticas diazotróficas, particularmente entre comunidades amostradas de diferentes tipos de solo, regime hídrico e regiões geográficas, mostrando ser esta variação dependente do ecossistema avaliado, com influência regional sobre a população, incluindo solo e clima. Dessa forma, as condições do ambiente podem ter sido mais favoráveis à espécie *A. brasilense* do que as demais espécies que compõem o mix.

Entretanto, os valores de interação mostram que o efeito da inoculação pode ser negativo ou positivo, dependendo da família estudada (Figura 2). Os valores de interação encontrados mostram que há uma influência da família estudada e também do ciclo avaliado, cana-planta e cana-soca, indicando novamente que outros fatores podem ter influenciado nos valores obtidos. As diferenças observadas entre as famílias também já foi verificada por Lopes et al. (2012) usando diferentes inoculantes a base de *A. brasilense*. Vários autores também mencionam que esta interação planta-bactéria pode ser positiva ou negativa, dependendo do genótipo vegetal e da espécie e/ou estirpe de bactéria (OLIVARES et al., 1997; MUÑOZ-ROJA e CABALLERO-MELLADO, 2003; OLIVEIRA et al., 2006; PEREIRA, 2011).

Os diferentes valores observados no caractere brix para a interação planta-bactéria também indicam que a seleção de plantas nessa fase inicial, onde não houve adubação nitrogenada, poderia ser uma alternativa à seleção de clones visando à melhor associação com PGPB. A exemplo da soja, onde a seleção em solos com baixo nível de nitrogênio, sem fertilização, e inoculação com *Bradyrhizobium*, favoreceu a interação e foi uma das responsáveis pelos altos índices de produtividade dessa cultura (ALVES et al., 2003; ALCANTARA et al., 2009). Lembrando que o brix é uma das principais características avaliadas nessa fase de seleção, definindo se um genótipo é selecionado ou não, além daquelas visuais (estatura, número de colmo por touceira, diâmetro e resistência a doenças) (MATSUOKA et al., 2005).

Nessas condições, onde se verifica efeito significativo para a interação família x inoculante, a inoculação de todas as plantas favoreceria aquelas com interação significativa e positiva, e desfavoreceria aquelas com interação negativa. Entretanto, a seleção de bactérias nativas com melhor adaptação ao ambiente de cultivo poderia favorecer também os resultados na cultura da cana-de-açúcar, assim como foi obtido para a soja (ALVES et al., 2003).

## 5.5 CONCLUSÕES

As 27 famílias de cana-de-açúcar apresentam resposta positiva e negativa à inoculação com bactérias fixadoras de nitrogênio e promotoras do desenvolvimento vegetal. A resposta varia dependendo da família estudada, do inoculante utilizado e da característica avaliada. Porém, verifica-se repetibilidade dos resultados, indicando que a resposta é a mesma, tanto em cana-planta como em cana-soca.

## 5.6 REFERÊNCIAS

- ALCANTARA, R. M. C. M.; ROCHA, M. M.; XAVIER, G. R.; RUMJANEK, N. G. 2009 Estado atual da arte quanto à seleção e o melhoramento de genótipos para a otimização da FBN. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Embrapa Meio-Norte, Documento 196, 31p.
- ALVES, B. J. R.; BODDEY, R. M.; URQUIAGA, S. 2003 The success of BNF in soybean in Brazil. *Plant and Soil*, v.252, p.1-9.
- BALDANI, I. J.; BALDANI, L.V. 2005 History on the biological nitrogen fixation research in graminaceous plants: special emphasis on the Brazilian experience. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, v.77, p.549-579. PMID:16127558.
- BASHAN, Y.; BASHAN, L. E. 2011 How the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum* promotes plant growth: A critical assessment. *Advances in Agronomy*, v.108, p.77-136. DOI: 10.1016/S0065-2113.
- BASHAN, Y.; DUBROVSKY, J. G. 1996 *Azospirillum* spp. participation in dry matter partitioning in grasses at the whole plant level. *Biology and Fertility of Soils*, v.23, p.435-440.
- CABALLERO-MELLADO, J.; MARTINEZ-ROMERO, E. 1994 Limited genetic diversity in the endophytic sugarcane bacterium *Acetobacter diazotrophicus*. *Applied and Environmental Microbiology*, v.60, n.5, p.1532-1537.
- COELHO, C. H. M.; MEDEIROS, A. F. A.; POLIDORO, J.C.; XAVIER, R. P.; RESENDE, A. 2003 Identification of genotypes of sugar cane with respect to their potential contribution from biological nitrogen fixation. *Agronomia*, v.37, p.37-40.
- DE RESENDE, M. D. V., 2006. O software selegen-Reml/Blup. Embrapa Informação Tecnológica, Campo Grande.
- DÖBEREINER, J.; BALDANI, V. L. D.; BALDANI, J. I. 1995 Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas. Brasília: Embrapa-SPI, 60p.
- EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUARIA (Embrapa). 1999 Sistema Brasileiro de classificação de solos. Brasília, 412p.

HARI, K.; SRINIVASAN, T. R. 2005. Response of sugarcane varieties to application of nitrogen fixing bacteria under different nitrogen levels. *Sugar Tech*, v.7, p.28-31.

HUNGRIA, M.; CAMPO, R. J.; SOUZA, E. M.; PEDROSA, F. O. 2010 Inoculation with selected strains of *Azospirillum brasilense* and *A. lipoferum* improves yields of maize and wheat in Brazil. *Plant and Soil*, v.331, p.413–425. DOI: 10.1007/s11104-009-0262-0.

LOPES, V. R.; BESPALHOK-FILHO, J. C.; ARAUJO, L.; RODRIGUES, F. V.; DAROS, E.; OLIVEIRA, R. A. 2012 The selection of sugarcane families that display better associations with plant growth promoting rhizobacteria. *Journal of Agronomy*, v.11, p.43-52. DOI: 10.3923/ja.2012.43.52

INSTITUTO AGRONÔMICO DO PARANÁ (IAPAR) 1994 Cartas Climáticas do Estado do Paraná. Instituto Agrônômico do Paraná, Londrina, 49p.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE) 2012 Indicadores IBGE: Estatística da Produção Agrícola. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, Brasília, 80p. Disponível em [http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/estProdAgr\\_201203.pdf](http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/estProdAgr_201203.pdf). Acesso em outubro de 2012.

MAGNANI, G. S.; DIDONET C. M.; CRUZ, L. M.; PICHETH, C. F.; PEDROSA, F. O.; SOUZA, E. M. 2010 Diversity of endophytic bacteria in Brazilian sugarcane. *Genetics and Molecular Research*, v.9, n.1, p.250-258.

MARIN, V. A.; BALDANI, V. L.; TEIXEIRA, K. R. S.; BALDANI, J. I. (1999) Fixação biológica de nitrogênio: bactérias fixadoras de nitrogênio e sua importância para a agricultura tropical. Disponível em [http://www.cnpab.embrapa.br/publicacoes/fbn\\_ao\\_leg.html](http://www.cnpab.embrapa.br/publicacoes/fbn_ao_leg.html). Acesso em novembro de 2010.

MATSUOKA, S.; GARCIA, A. A. F.; ARIZONO, H. 2005 Melhoramento da cana-de-açúcar. In: BOREM, A. Melhoramento de espécies cultivadas. Viçosa: Editora UFV, p.205-251.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. Microbiologia e Bioquímica do Solo. 2006. 2ª ed., Editora UFLA. 729p.

MOUTIA, J. F. Y.; SAUMTALLY, S.; SPAEPEN, S.; VANDERLEYDEN, J. 2010 Plant growth promotion by *Azospirillum* sp. in sugarcane is influenced by genotype and drought stress. *Plant and Soil*, v.337, p.233–242. DOI: 10.1007/s11104-010-0519-7.

MUNOS-ROJAS, J.; CABALLERO-MELLADO, J. 2003 Population dynamics of *Gluconacetobacter diazotrophicus* in sugarcane cultivars and effect on plant grow. Microbial Ecology, v.45, p.454-464. DOI: 10.1007/s00248-003-0110-3.

OLIVARES, F. L.; JAMES, E. K.; BALDANI, J. I.; DOBEREINER, J. 1997 Infection of mottled stripe disease-susceptible and resistant sugar cane varieties by the endophytic diazotrophic *Herbaspirillum*. New Phytologist, v.135, p.723-737. DOI: 10.1046/j.1469-8137.1997.00684.x.

OLIVEIRA, A. L. M.; CANUTO, E. L.; URQUIAGA, S.; REIS, V. M.; BALDANI, J. I. 2006 Yield of micropropagated sugarcane varieties in different soil types following inoculation with diazotrophic bacteria. Plant and Soil, v.284, p.23-32.

OLIVEIRA, A. L. M.; STOFFELS, M.; SCHMID, M.; REIS, V. M.; BALDANI, J. I.; HARTMANN, A. 2009 Colonization of sugarcane plantlets by mixed inoculations with diazotrophic bacteria. European Journal of Soil Biology, v.4, n.5, p.106–113.

PEDRINHO, E. A. N.; GALDIANO JR., R. F.; CAMPANHARO, J. C.; ALVES, L. M. C.; LEMOS, E. G. M. 2010 Identification and evaluation of bacteria isolated from roots of maize. Bragantia, v.69, p.905-912.

PEDROZO, C. A.; BARBOSA, M. H. P.; SILVA, F. L.; RESENDE, M. D. V.; PETERNELLI, L. A. 2011 Repeatability of full-sib sugarcane families across harvests and the efficiency of early selection. Euphytica, v.182, p.423–430. DOI 10.1007/s10681-011-0521-z

PEREIRA, W. 2011 Produtividade e qualidade tecnológica da cana-de-açúcar inoculada com bactérias diazotróficas. Dissertação de Mestrado, UFRRJ, Seropédica-RJ, 70p.

ROESCH, L. F. W.; PASSAGLIA, L. M. P.; BENTO, F. M.; TRIPLETT, E. W.; CAMARGO, F. A. O. 2007 Diversidade de bactérias diazotróficas endofíticas associadas a plantas de milho. Revista Brasileira de Ciência do Solo, v.31, p.1367-1380.

TEJERA; N.; LLUCH, C.; MARTÍNEZ-TOLEDO, M. V.; GONZÁLEZ-LOPEZ, G. 2005 Isolation and characterization of *Azotobacter* and *Azospirillum* strains from the sugarcane rhizosphere. Plant and Soil, v.270, p. 223–232. DOI 10.1007/s11104-004-1522-7.

TORTORA, M. L.; DIAZ-RICCI, J. C.; PEDRAZA, R. O. 2011 *Azospirillum brasilense* siderophores with antifungal activity against *Colletotrichum acutatum*. Archives of Microbiology, v.193, p.275–286. DOI 10.1007/s00203-010-0672-7



URQUIAGA, S.; CRUZ, K. S.; BODDEY, R. M. 1992 Contribution of nitrogen fixation to sugar cane: Nitrogen-15 and nitrogen-balance estimates. *Soil Science Society of America Journal*, v.56, p.105–114. DOI: 10.2136/sssaj1992.03615995005600010017x

### CAPÍTULO III - RESPOSTA DE CLONES DE CANA-DE-AÇÚCAR A INOCULAÇÃO COM ESTIRPES DE *Azospirillum brasilense* NA FASE T2 DE UM PROGRAMA DE MELHORAMENTO GENÉTICO.<sup>5</sup>

#### RESUMO

A resposta de famílias de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) à inoculação com bactérias promotoras do crescimento vegetal na fase inicial de seleção do melhoramento genético, vem demonstrando que pode haver uma interação significativa, positiva ou negativa, entre famílias e bactérias. Entretanto não se sabe se esta interação em determinada família presente em fases iniciais repete-se em fases mais avançadas e se, a resposta dos clones individualmente refletem realmente a resposta da família. Dessa forma este trabalho teve como objetivo avaliar a resposta de 20 clones de cana-de-açúcar, provenientes de 17 famílias pré-selecionadas quanto à resposta à inoculação com *Azospirillum brasilense*, em cana-planta e cana-soca e a permanência das bactérias inoculadas ao longo dos ciclos. Foram usados três diferentes tratamentos: um inoculante composto por três estirpes de *A. brasilense*, Ab-v5, Ab-v6 e Ab-v7, denominado Triazo; um inoculante composto apenas pela estirpe IC26; e o controle, sem inoculação. Os inoculantes foram pulverizados no sulco de plantio, no início de cada ciclo, cana-planta e cana-soca. As avaliações realizadas foram: biométrica e tecnológica em cana-planta e cana-soca; níveis de nitrogênio na folha +1 em cana-soca; e análise da população de bactérias nas raízes e rizosfera a cada quatro meses, em cana-planta e cana-soca. Os valores de correlação de *Spearman* variaram de acordo com o caractere estudado e ciclo da cultura, tanto para os caracteres biométricos quanto tecnológicos. Também se verificou diferença entre os teores de nitrogênio na folha +1, dependendo do clone e tratamento utilizado. A população de bactérias esteve presente durante todo o ciclo da cultura e não foi verificada diferença estatística entre os tipos de tratamentos para esta avaliação. Os resultados observados mostraram que houve diferença na resposta dos clones, dependendo do tratamento utilizado e sugerem que mais estudos devem ser realizados nesse sentido.

**Palavras-chave:** interação planta-bactéria, nitrogênio, PGPB, FBN

#### ABSTRACT

The response of the sugarcane families to inoculation with plant growth promoting bacteria, in the initial phase of the breeding selection, show that there is significant interaction, positive or negative, between family and bacteria, depending on the family studied. However isn't known if this interaction present on initial phase of breeding will repeat in advanced phases and the response of clones really reflect the family response. For these reasons the present study has the aim to evaluate the response of 20 sugarcane clones, from 17 pre-selected sugarcane families, inoculated with *Azospirillum brasilense* in two cycles of evaluation, in

---

<sup>5</sup> Este Capítulo refere-se ao Experimento 3

plant and first ratoon. The clones were treated with an inoculant (named Triazo) composed with three strains of *A. brasilense*, Abv5, Abv6 and Abv7, or with an inoculant composed for the IC26 strain, or no inoculated. The treatments were made in furrow, spraying in the beginning of each cycle. The evaluations made were: biometric and technologic parameters in plant and first ratoon; level of nitrogen on +1 leaf in first ratoon; and analysis of the bacteria population on root and rizhosphere every four months, in plant and first ratoon. The values of *Spearman* correlation's varied according to the character studied and the culture cycle, for both, biometric and technologic characters. There was a difference between the levels of nitrogen in the leaf depending on the clone and treatment used. The population of bacteria was present during the whole crop cycle and no statistical difference was found among the types of treatments for this evaluation. The results observed showed that there are differences in the response of clones depending on the treatment used and suggest that further studies should be conducted accordingly.

**Key-words:** plant-bacteria interactions, nitrogen, FBN, PGPB

## 6.1 INTRODUÇÃO

A cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) é uma representante da família *Poaceae*, segundo classificação proposta por Cronquist (1981). Essa cultura apresenta altas produtividades de biomassa, necessitando para isso de altas doses de fertilizantes, principalmente os nitrogenados (MATSUOKA et al., 2005; MOREIRA e SIQUEIRA, 2006).

Entretanto, essa cultura tem a capacidade de se associar a bactérias fixadoras de nitrogênio e promotoras do crescimento vegetal (*Plant Growth Promoting Bactéria* – PGPB), e dessa forma obter parte desse nutriente de forma biológica, reduzindo assim a aplicação de adubos nitrogenados (BALDANI e BALDANI, 2005).

Alguns trabalhos têm evidenciado que a inoculação com bactérias fixadoras de nitrogênio podem reduzir pela metade a necessidade de adubação, sem haver perda de produtividade (PEREIRA, 2011). Afirma-se ainda, que durante muito tempo áreas plantadas com cana-de-açúcar foram beneficiadas pela associação com essas bactérias, uma vez que foi observado nessas áreas, que mesmo sem a adição da adubação nitrogenada ao longo dos ciclos, não foi verificada a deficiência de nitrogênio e nem perdas de produtividade (FUENTES-RAMIREZ et al., 1999).

Os principais gêneros de PGPB estudados são: *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Azoarcus*, *Burkholderia*, *Beijerinckia*, *Gluconacetobacter* e *Herbaspirillum* (BALDANI e BALDANI, 2005). Entretanto, esse tipo de associação possui menor eficiência em relação àquela promovida por bactérias simbióticas, como no caso da soja (MARIN et al., 1999), e por este motivo a resposta de cultivares de cana-de-açúcar à inoculação com bactérias fixadoras de

nitrogênio é dependente da estirpe, cepa e espécie de bactéria utilizada (REIS JÚNIOR et al., 2000; MUÑOS-ROJAS e CABALLERO-MELLADO, 2003; BALDANI e BALDANI, 2005)

Vários trabalhos mostraram o efeito dessas bactérias em diferentes genótipos de cana-de-açúcar, entretanto, alguns autores enfatizam a necessidade de não só selecionar melhores estirpes e espécies de bactérias para maximizar esse efeito, mas selecionar o genótipo vegetal, através do melhoramento genético. Além disso, estudos tem demonstrado que a planta exerce uma função determinante no sucesso da interação e atua diretamente nessa associação (MUÑOS-ROJAS e CABALLERO-MELLADO, 2003; NOGUEIRA et al., 2001; VINAGRE et al., 2006; CARVALHO et al., 2011).

Pereira (2011) verificou aumento do brix em cultivares de cana-de-açúcar tratadas com um inoculante composto por cinco espécies de PGPB, bem como diferenças em caracteres tecnológicos de plantas inoculadas, mencionando que os benefícios do uso dessas bactérias não estariam associados apenas ao aumento de biomassa e FBN.

Nesse sentido, Lopes et al. (2012) verificaram que famílias de cana-de-açúcar apresentaram respostas diferenciadas ao tratamento com dois diferentes inoculantes a base de *Azospirillum brasilense*. Esses autores estudaram 54 famílias de cana-de-açúcar e verificaram que houve efeito da inoculação nas famílias, podendo ser negativo ou positivo, dependendo do tratamento e da família estudada. Porém, não foi possível verificar se esse efeito era constante (vários ciclos) e se ao selecionar plantas dessas famílias, as mesmas apresentariam resposta semelhantes quando submetidas aos mesmos tratamentos. Esses autores também observaram interação significativa, positiva e negativa, entre tratamento e família avaliada, indicando que a inoculação com PGPB poderia aumentar o brix das plantas inoculadas, dependendo da família estudada.

Com base nesses preceitos, este trabalho teve como objetivo avaliar a resposta de 20 clones de cana-de-açúcar, selecionados a partir de 17 das famílias estudadas por Lopes et al. (2012), ao tratamento com dois diferentes inoculantes a base de *A. brasilense*. Também se objetivou verificar a permanência das bactérias nas raízes e rizomas das plantas ao longo dos ciclos de cultivo.

## 6.2 MATERIAL E MÉTODOS

### 6.2.1 Local de instalação do experimento

O experimento foi conduzido na Estação Experimental de Paranavaí da Universidade Federal do Paraná, no município de Paranavaí/PR (23°05'S, 52°27'W, altitude de 503 m), nos anos de 2010, 2011 e 2012. O clima da região de acordo com classificação de Köppen é o Cfa, clima Subtropical Úmido (Mesotérmico), com temperatura média do mês mais quente superior a 22° C e no mês mais frio inferior a 18° C, sem estação seca definida, verão quente e geadas pouco frequentes (IAPAR, 1994).

O solo da área experimental é classificado no Brasil como Latossolo Vermelho Escuro Distrófico (EMBRAPA, 1999).

O resultado da análise de nitrogênio no solo para cada faixa (tratamento), nas camadas de 0-20 cm e de 20-40 cm, amostradas na linha e na entrelinha de plantio está na Tabela 1.

**Tabela 1:** Valores médios para o teor de nitrogênio presente no solo antes da implantação do experimento.

<b>Faixa (tratamento)</b>	<b>profundidade em centímetros</b>	<b>nitrogênio%</b>
<i>Entrelinha</i>	0-20	0,052855
<i>Entrelinha</i>	20-40	0,061834
<i>Não inoculada</i>	0-20	0,062858
<i>Não inoculada</i>	20-40	0,068472
<i>IC26</i>	0-20	0,052690
<i>IC26</i>	20-40	0,052748
<i>Triazo</i>	0-20	0,063609
<i>Triazo</i>	20-40	0,053434

#### 6.2.2 Material vegetal

Clones de diferentes famílias de cana-de-açúcar provenientes da fase T1 da série 2008 (LOPES et al., 2012), que apresentaram quantidade de colmos suficiente em todos os tratamentos, foram selecionados passando para uma nova fase de avaliação, denominada T2 adiantado. Para cada família foi selecionada uma planta contendo no mínimo 15 colmos no tratamento sem inoculante e com características superiores de vigor. As famílias escolhidas estão na Tabela 2, com os respectivos números dos clones.

#### 6.2.3 Campo experimental e tratamentos

Nessa nova fase, cada clone selecionado dentro das melhores famílias foi plantado em

novo campo experimental, com uma repetição por tratamento. Cada repetição foi constituída de uma linha de 5 m, contendo o mesmo indivíduo. Ao todo foram selecionadas 17 famílias totalizando 20 clones.

**Tabela 2:** Relação de clones selecionados com o número recebido (identificação) e a família de origem (selecionado em T1).

Clone	Cruzamento	Família de origem <sup>1</sup>	Clone	Cruzamento	Família de origem
1	H641881 X RB01616	1	31	RB955114 X RB845197	49
4	RB001622 X RB92579	6	35	RB955114 X RB845197	49
8	RB01616 X H641881	4	37	RB956911 X RB93509	12
12	RB813804 X RB72910	20	40	RB971765 X RB93509	28
15	RB845210 X SP832847	47	43	RB977619 x RB867515	39
18	RB855002 X RB93509	23	47	RB99361 X RB98710	29
20	RB867515 X RB977619	37	49	RB99382 X RB98710	16
21	RB867515 X RB977619	37	52	RB99382 X RB98710	16
26	RB92606 X H566724	36	57	SP835073 X RB92579	2
29	RB93509 X RB845257	7	60	SP853877 X RB931565	48

<sup>1</sup> Número da família de acordo com Lopes et al., 2012

O espaçamento utilizado foi o de 1,40 m entre linhas e foram utilizadas 18 gemas por metro linear. Como bordadura foi utilizado o clone RB986419.

O plantio foi realizado em maio de 2010. A adubação foi realizada na linha de plantio, sendo que cada linha de 5 m recebeu 540 g de cloreto de potássio e 180 g de superfostato simples, sem adição de adubo nitrogenado. O manejo seguiu o padrão para a cultura da cana-de-açúcar, com aplicação de herbicida pré-emergência, capinas pós-emergência e sem irrigação.

Os tratamentos nessa nova fase foram os mesmos usados na fase anterior (T1 – série 2008) – Experimento 1.

#### 6.2.3.1 Tratamentos

Os clones selecionados de plantas não inoculadas na fase T1 (Capítulo 1) foram plantados em três linhas de 5 metros cada, sendo que cada linha recebeu os seguintes tratamentos: T0 – controle (sem inoculação); T1 – plantas inoculadas com *A. brasilense* cepa IC26; T2 – plantas inoculadas com *A. brasilense* cepas Abv5, Abv6 e Abv7.

#### 6.2.4 Estirpes utilizadas e inoculantes

As estirpes Abv5, Abv6, Abv7 e IC26 de *A. brasilense* foram fornecidas pelo Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular a Universidade Federal do Paraná (UFPR), Curitiba, Paraná. Os inoculantes foram preparados conforme citado por Lopes et al. (2012).

#### 6.2.5 Inoculação

A inoculação foi realizada no sulco de plantio antes do fechamento do sulco. Os inoculantes foram diluídos em água, mantendo-se o pH próximo ao ideal (6,8), com a aplicação de KOH ou HCl para evitar a morte das células, e então aplicados com pulverizador costal no sulco de plantio, calibrado para um volume de 250 l de calda por hectare. A concentração final dos inoculantes foi de aproximadamente  $1 \times 10^9$  cfu ml<sup>-1</sup>.

#### 6.2.6 Avaliações

As avaliações foram realizadas em dois anos de cultivo, cana-planta e cana-soca. Foram realizadas análises biométricas (em todos os clones), tecnológica (para aqueles clones repetidos nos três tratamentos), de nitrogênio (para todos os clones) e coletas de solo para acompanhamento da população de bactérias (três clones aleatórios).

##### 6.2.6.1 Análise Biométrica

Os caracteres biométricos avaliados foram: número de colmos por linha (parcela) (NC); estatura das plantas (EST), em metros, a partir da primeira folha com o *dewlap* visível até a base do colmo; diâmetro dos colmos (DIA), em centímetros, no terceiro entrenó a partir da base; brix; e massa média de 10 colmos (M10) em quilos.

#### 6.2.6.2 *Análise Tecnológica*

Para a análise tecnológica foram coletados e pesados 10 colmos da parte central da linha, para evitar o efeito de bordadura. Os colmos foram enviados para Usinas conveniadas ao Programa de Melhoramento Genético de Cana-de-açúcar da UFPR, que realizaram a avaliação dos caracteres tecnológicos: pol cana, pureza, fibra, açúcar total recuperável (ATR), e açúcar recuperável (AR), segundo Pereira (2011):

Pureza – é a porcentagem de sacarose contida nos sólidos solúveis, reflete a relação entre teor de sacarose e todos os demais sólidos solúveis. A pureza é um parâmetro calculado e não avaliado por equipamentos.

Pol – representa a porcentagem aparente de sacarose contida numa solução de açúcares. É o principal parâmetro da determinação de qualidade da cana-de-açúcar e corresponde a 14 –24% do total de açúcares da cana.

Fibra – é a matéria insolúvel contida na cana. A determinação do teor de fibra é feita a partir do bagaço úmido obtido após a extração do caldo da amostra de 500 g de cana desfibrada para extração do caldo.

Açúcares redutores (AR) – açúcares (glicose e frutose, principalmente) que apresentam a propriedade de reduzir o cobre do estado cúprico para cuproso.

Açúcar total recuperável (ATR) – representa a quantidade de açúcares redutores totais recuperada da cana. É um dos parâmetros do sistema de pagamento de cana implantado em alguns estados produtores. Está diretamente relacionado com pol e AR.

#### 6.2.6.3 *Análise do teor de nitrogênio nas folhas*

A análise do teor de nitrogênio foi feita em cana-soca aos nove meses. Foram coletadas cinco amostras de cada parcela, sendo que cada amostra foi retirada do terço médio da folha +1 (RAIJ e CANTARELLA, 1997). Após coletadas, as folhas foram lavadas com água destilada, enxaguadas duas vezes e então secas em estufa a 60°C por 48 horas. As amostras foram enviadas então ao laboratório de Nutrição Mineral da Universidade Federal de Viçosa para análise do teor de nitrogênio.

#### 6.2.6.4 *Reisolamento da população de bactérias da espécie *Azospirillum brasilense**



O reisolamento das bactérias foi realizado a cada três meses desde o início do experimento. Ao todo foram realizadas quatro amostragens de raiz e rizoma em cana-planta e três amostragens em cana-soca. A cada coleta foram retiradas amostras de um clone, sendo uma amostra de cada tratamento, conforme especificado no item 5.2.3.1. A relação das amostras com o número dos respectivos clones está na Tabela 3.

Os clones foram escolhidos aleatoriamente para amostragem. Sendo que na contagem final do número de colmos, aqueles clones que tiveram colmos destruídos para a coleta de amostras de raiz, também foram considerados.

As amostras de raiz e de rizoma coletadas foram embaladas em sacos plásticos e mantidas refrigeradas até o momento do preparo das amostras.

**Tabela 3:** Relação de amostras retiradas ao longo do experimento para o reisolamento das bactérias, número dos respectivos clones e meses de coleta em cana-planta.

DATAS DAS COLETAS EM CANA-PLANTA							
	Agosto de 2010	Dezembro de 2010	Março de 2011	Julho de 2011	Dezembro de 2011	Março de 2012	Julho de 2012
Trat.	Clone	Clone	Clone	Clone	Clone	Clone	Clone
Controle	49	12	8	26	49	12	29
IC26	49	12	8	26	49	12	29
Triazo	49	12	8	26	49	12	29

O preparo das amostras foi realizado no Laboratório de Micropropagação Vegetal da Universidade Federal do Paraná e a metodologia para reisolamento das bactérias da espécie *A. brasilense* foi a mesma descrita por Döbereiner et al. (1995). Para a contagem do número de células bacterianas foi usada a metodologia do Número Mais Provável (NMP) de acordo com a Tabela de Maccready, também citado por Döbereiner et al. (1995). Após transformação dos dados, os mesmos foram representados por logaritmo do número de células por grama de tecido vegetal ( $\log$  do nº células  $\text{g}^{-1}$  tec.).

#### 6.2.7 Análise estatística

Na análise dos dados biométricos foi utilizada a correlação de *Spearman* para verificar se a classificação dos clones (*ranking*), para cada caractere estudado, foi alterada com os tratamentos. Para a análise dos 20 clones, nos três tratamentos avaliados e nos dois ciclos, foi utilizado o *software* Sigma Plot 11.0. A mesma metodologia foi utilizada para a análise dos

caracteres tecnológicos.

Para a análise do teor de nitrogênio nas folhas, e para avaliação da população de bactérias presente nas raízes e rizomas, foi realizada a Anova utilizando-se o *software* Sigma Plot 11.0.

## 6.3 RESULTADOS

### 6.3.1 Análise Biométrica

Os dados de correlação de *Spearman* para os caracteres biométricos avaliados, em cana-planta e cana-soca, estão presentes na Tabela 4. Valores significativos e positivos indicam que houve pouca ou nenhuma diferença no *ranking* dos clones quando submetidos a diferentes tratamentos. Valores não significativos indicam que o *ranking* foi alterado, entretanto não houve um padrão de resposta (não correlacionados). Já valores significativos e negativos indicam que o *ranking* foi invertido, ou seja, aqueles clones que foram os melhores para determinado tratamento, foram os piores para o tratamento a que foi comparado, e vice-versa.

**Tabela 4:** Valores de correlação de *Spearman* entre os tratamentos, para os caracteres biométricos analisados nos 20 clones de cana-de-açúcar, dados de cana-planta e cana-soca. Estatura da planta (EST), diâmetro do colmo (DIA), brix, número de colmos por metro (NCM) e massa média de 10 colmos (M10).

CANA-PLANTA					
Tratamentos correlacionados	Caracteres biométricos				
	EST	DIA	brix	NCM	M10
Controle x IC26	0,232	-0,189	0,652 *	0,479 *	0,405
Controle x Triazo	0,096	0,016	0,583 *	0,483 *	0,144
IC26 x Triazo	0,592 *	0,469 *	0,587 *	0,693 *	0,546 *
CANA-SOCA					
Tratamentos correlacionados	Caracteres biométricos				
	EST	DIA	brix	NCM	M10
Controle x IC26	0,669 *	0,388	0,759 *	0,248	-0,36
Controle x Triazo	0,704 *	0,480*	0,508 *	0,441	0,070
IC26 x Triazo	0,812 *	0,412	0,451 *	0,049	0,482 *

\* Valores de correlação significativos a 5% de probabilidade

Como é possível observar, em cana-planta os tratamentos com IC26 e Triazo quando comparados, não alteraram de forma significativa o *ranking* dos 20 clones, independente do

caractere avaliado. O mesmo resultado foi observado para os caracteres brix e número de colmos por metro, em que não houve diferença significativa no *ranking*, independente do tratamento avaliado.

Entretanto, para estatura, diâmetro e massa média de 10 colmos houve alteração no *ranking* dos clones quando comparados os tratamento controle com IC26 e controle com Triazo.

Porém, em cana-soca os resultados não permaneceram os mesmos, exceto para brix, em que também não houve diferença significativa para os valores de correlação entre os tratamentos. Também não foi observada diferença no *ranking* para a variável estatura. Já a variável número de colmos por metro não apresentou valores significativos de correlação, indicando que houve alteração no *ranking* dependendo do tratamento. A variável diâmetro apresentou valor significativo e positivo de correlação somente quando se analisou os tratamentos controle e Triazo, enquanto a variável massa média de 10 colmos apresentou o mesmo resultado quando se analisou IC26 e Triazo. Os demais valores de correlações para estes dois caracteres não foram significativos, indicando que houve alteração no *ranking*, dependendo do tratamento utilizado.

Como pode ser observado, os resultados não apresentaram um padrão de resposta entre as colheitas, cana-planta e cana-soca, exceto para o caractere brix. Os valores significativos indicam que não houve alteração no *ranking*, evidenciando que o tratamento, de forma geral, não teve influência no desempenho das características avaliadas.

### 6.3.2 Análise Tecnológica

Os valores de correlação de *Spearman* para os caracteres tecnológicos avaliados estão na Tabela 5.

Como pode ser verificado, houve diferença significativa para o caractere pol quando se comparou o tratamento Controle com os tratamentos inoculados, indicando que houve diferença entre o *ranking* apenas quando comparados os dois tratamentos inoculados. Também não foi verificada diferença no *ranking* para os caracteres fibra e ATR, indicando que esses caracteres não foram influenciados pelo tratamento. Já para o caractere AR, não houve diferença no *ranking*, apenas quando foi comparado o tratamento controle com o inoculado com IC26. Entretanto o caractere pureza apresentou diferença no *ranking* em todos os tratamentos, indicando que houve efeito do tratamento para esse caractere.

**Tabela 5:** Valores de correlação de *Spearman* entre os tratamentos, para os caracteres tecnológicos analisados nos 20 clones de cana-de-açúcar, dados de cana-planta e cana-soca.

CANA-PLANTA					
Tratamentos correlacionados	Caracteres tecnológicos				
	<i>Pol</i>	<i>Pureza</i>	<i>Fibra</i>	<i>AR%</i>	<i>ATR</i>
Controle x IC26	0,734*	0,407	0,815*	0,565*	0,766*
Controle x Triazo	0,613*	0,123	0,490*	0,152	0,526*
IC26 x Triazo	0,323	0,307	0,608*	0,283	0,471*
CANA-SOCA					
Tratamentos correlacionados	Caracteres tecnológicos				
	<i>Pol</i>	<i>Pureza</i>	<i>Fibra</i>	<i>AR%</i>	<i>ATR</i>
Controle x IC26	0,448*	0,0155	0,336	0,015	0,272
Controle x Triazo	0,392	0,0849	0,412	0,085	0,349
IC26 x Triazo	0,501*	0,3200	0,322	0,320	0,362

\* Valores de correlação significativos a 5% de probabilidade

Em cana-soca observou-se correlação significativa apenas para o caractere *pol*, quando comparados os tratamento controle com IC26 e os dois tratamentos inoculados (Triazo e IC26), demonstrando que apenas para este caractere e nestes tratamentos não houve diferença na ordem dos clones. Para os demais caracteres houve diferença no *ranking* dos clones, indicando que dependendo do clone usado ou do tratamento houve aumento ou redução nos valores dos caracteres (Tabela 6).

Verificou-se que houve diferença nos resultados obtidos em cana-planta e cana-soca, mostrando que o efeito do tratamento pode ter sido maior no segundo ciclo da cultura, onde o *ranking* para a maior parte dos caracteres estudados foi alterado, ou seja, o mesmo clone teve resposta diferente dependendo do tratamento recebido.

Devido à falta de repetições, por ser experimento realizado em fase inicial de seleção, com pequena quantidade de colmos disponíveis, não foi possível comparar os resultados obtidos em nível de família (Experimento 1 – Capítulo I) com os resultados obtidos na avaliação dos clones (Experimento 3). Sendo assim, não foi possível verificar se a resposta à inoculação realizada nas famílias se repetiria nos clones provenientes dessa família.

### 6.3.3 Análise de Nitrogênio

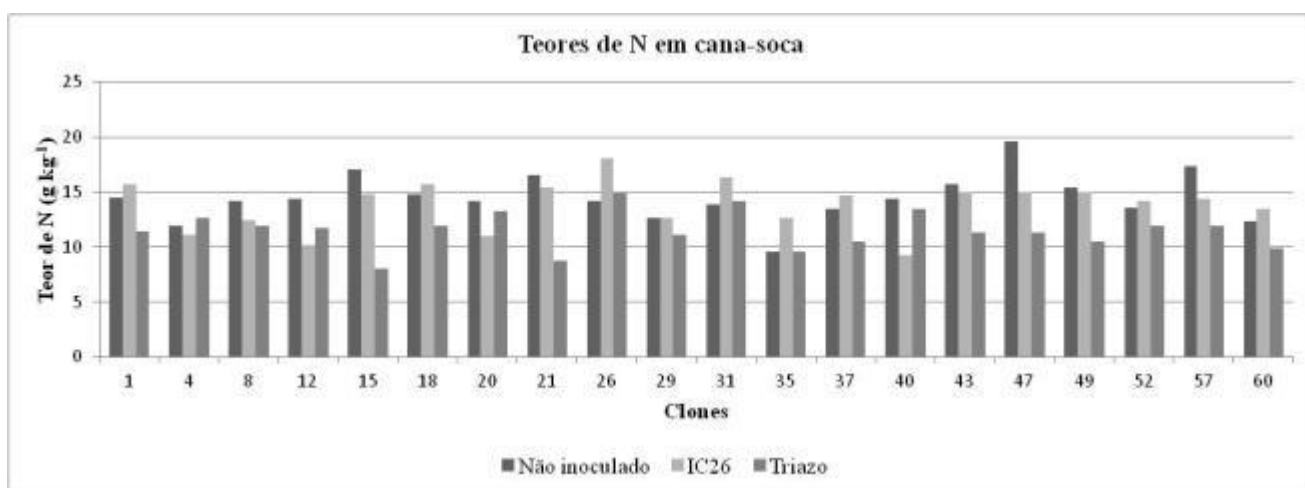
Os valores médios para os teores de nitrogênio nas folhas dos clones de cana-de-açúcar (cana-soca), de acordo com os tratamentos, estão na Tabela 6.

**Tabela 6:** Teores médios de nitrogênio na folha +1 dos 20 clones de cana-de-açúcar, nove meses após o plantio, de acordo com os tratamentos analisados em ciclo de cana-soca. .

Tratamento	Média* para os teores de nitrogênio (g kg <sup>-1</sup> )
Triazo	11,52 b
IC26	13,87 a
Não inoculado	14,50 a
CV%	15,44
Média geral	13,30

\* Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Os resultados mostraram que houve diferença significativa entre os tratamentos ao nível de 5% de probabilidade. Entretanto a resposta obtida foi diferente daquela esperada, uma vez que plantas inoculadas com Triazo apresentaram menor teor de nitrogênio (11,52 g kg<sup>-1</sup>) em relação ao controle não inoculado, e plantas inoculadas com IC26 apresentaram valores inferiores (13,87 g kg<sup>-1</sup>) em relação ao controle (14,50 g kg<sup>-1</sup>), resultado este não significativo.



**Figura 1:** Teores de nitrogênio na folha +1 em 20 clones de cana-de-açúcar. Amostras coletadas 9 meses após o plantio em ciclo de cana-soca.

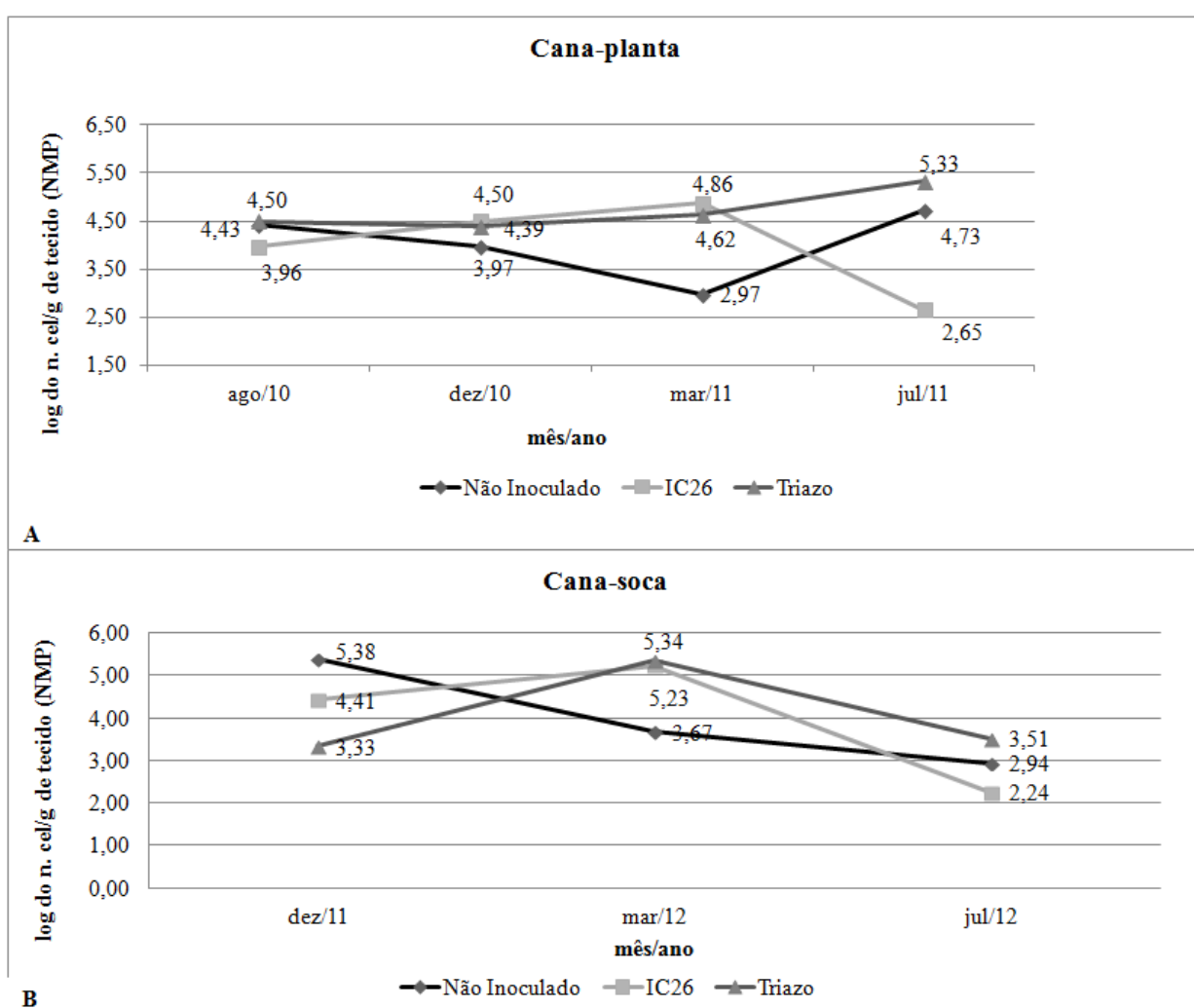
Embora a média geral tenha mostrado que plantas não inoculadas apresentaram maior teor de nitrogênio na folha, os resultados para cada clone foram diferenciados, como pode ser observado na Figura 1. Os clones 1, 18, 26, 31, 35, 37, 52 e 60 apresentaram valores superiores para o teor de nitrogênio quando inoculados com IC26, enquanto apenas o clone 4 apresentou melhor resposta quando inoculado com Triazo. Os demais clones apresentaram resultados superiores quando não inoculados, demonstrando a interação genótipo-bactéria.

#### 6.3.4 Reisolamento das bactérias

Os resultados obtidos nas coletas e reisolamento das bactérias (NMP) ao longo dos dois ciclos de cultivo, cana-planta e cana-soca, foram organizados de duas formas: a população média de acordo com os tratamentos recebidos ao longo dos ciclos; e a população média considerando-se todas as coletas e de acordo com os tratamentos recebidos.

#### 6.3.4.1 População das bactérias ao longo dos dois ciclos de cultivo

Como pode ser observado na Figura 2, a população de bactérias esteve presente nos clones de cana-de-açúcar em todas as épocas de coleta e em todos os tratamentos observados.



**Figura 2:** População de bactérias da espécie *Azospirillum brasilense* em amostras de raiz e rizoma, coletadas a cada três meses, ao longo de dois anos de cultivo, cana-planta (A) e cana-soca (B), de acordo com os diferentes tratamentos. Valores em log do nº de cfu.g<sup>-1</sup> de tecido.

Pelos gráficos da Figura 2, verifica-se que a população de bactérias em cana-planta permaneceu constante nos período de agosto de 2010 a dezembro de 2010, havendo variações

em março e julho de 2011, dependendo do tratamento utilizado. Plantas não inoculadas apresentaram uma menor população em março de 2011 (2,97) e aumento em julho de 2011 (4,73). Já plantas tratadas com IC26 apresentaram valores mais baixos em julho de 2011 (2,65), enquanto plantas inoculadas com Triazo apresentaram valores de população constantes.

Em cana-soca as plantas não inoculadas apresentaram redução da população ao longo do tempo, enquanto plantas tratadas tanto com IC26 quanto com Triazo, apresentaram aumento em março de 2012 e depois uma redução em julho de 2012.

Entretanto, independente do tratamento utilizado (não inoculado, Triazo ou IC26) o comportamento da população foi semelhante ao longo do ano, indicando que as populações nativas e inoculadas apresentaram respostas semelhantes às condições ambientais, ao longo do ciclo da cultura.

As datas de coleta foram realizadas com espaço de três meses não somente com o objetivo de verificar a presença das bactérias, mas também para verificar a dinâmica da população ao longo das estações do ano. Os resultados em cana-soca mostraram que durante o período próximo ao inverno houve uma redução da população. Entretanto esses resultados não foram significativos, indicando que, embora haja redução da população nesse período, a mesma volta a crescer nos períodos mais quentes do ano (verão).

Em cana-planta não foi observada a mesma tendência, entretanto outros fatores podem ter influenciado o resultado obtido, como a própria metodologia utilizada.

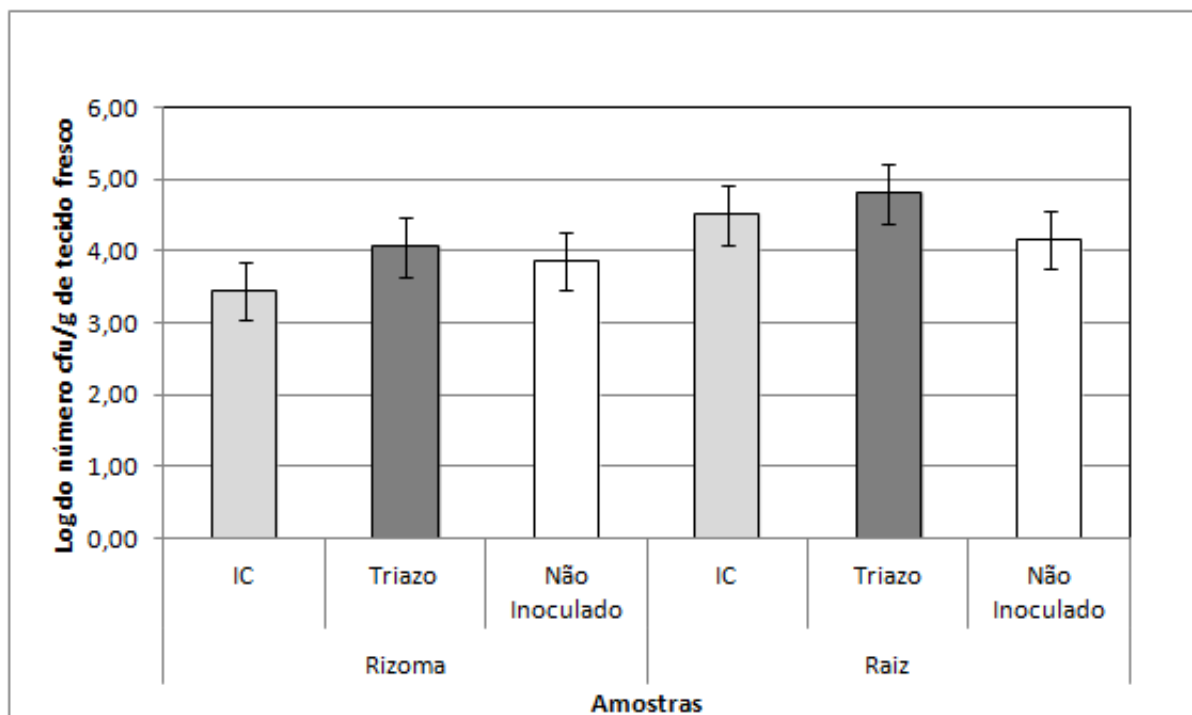
Estes dados não são suficientes para demonstrar a eficiência das bactérias e sua atividade durante o ciclo da cultura, entretanto mostram a capacidade das mesmas de sobreviverem no solo e permanecer na raiz e rizosfera da planta mesmo após o corte da parte aérea e mesmo após o inverno, onde a temperatura mínima média fica em torno de 18°C.

As populações detectadas em plantas não inoculadas mostram que há a presença de bactérias nativas, provavelmente da mesma espécie, indicando também que as condições do ambiente são favoráveis à espécie.

#### *6.3.4.2 População de bactérias da espécie *Azospirillum brasilense* em raízes e rizomas dos clones de cana-de-açúcar*

A concentração da população nos diferentes tratamentos (média) pode ser observada na Figura 3, onde são apresentadas as médias das populações de bactérias nos clones de cana-

de-açúcar.



**Figura 3:** Valores médios da população de bactéria de acordo com o tratamento utilizado, não inoculado, IC26 e Triazo, no rizoma e raiz de clones de cana-de-açúcar. Média feita com base em 21 amostras e 7 coletas.

Como pode ser observado na Figura 3, não houve diferença significativa na população de bactérias independentemente do tratamento utilizado e do tecido de onde foi isolada, raiz ou rizoma.

Entretanto, mesmo não havendo resultado significativo, a população presente nos tecidos da raiz, em média, mostrou-se maior em relação à do rizoma, e plantas inoculadas mostraram uma população também um pouco maior em relação a plantas não inoculadas, exceto aquela no rizoma de clones tratados com IC26 (Figura 3).

Já nos tecidos da raiz, verificou-se que plantas inoculadas tanto com IC26 quanto com Triazo apresentaram uma população maior em relação a plantas não inoculadas. Essa informação mostra que para estes clones, a inoculação foi eficiente no aumento da população de bactérias na região da raiz, entretanto não alterou a população no rizoma da planta.

## 6.4 DISCUSSÃO

### 6.4.1 Análise biométrica



Na análise biométrica, para o caractere brix (Tabela 5), os tratamentos não alteraram o *ranking* dos clones de cana-de-açúcar tanto em cana-planta como em cana-soca. Estes resultados são diferentes daquele observados nos experimentos realizados com famílias, em que esse caractere apresentou diferença significativa para a interação planta-bactéria (LOPES et al., 2012). Porém, vale ressaltar que o caractere brix apresenta alta herdabilidade, sendo um dos caracteres mais estáveis (FERREIRA et al., 2005; LEITE et al., 2006; MELO et al., 2006), o que pode, em parte, explicar tal resultado. Entretanto, como o efeito da inoculação pode ser positivo ou negativo, a diferença entre clones pode influenciar neste resultado, diferença individual, onde alguns clones apresentaram melhoria com a inoculação enquanto outros tiveram efeito negativo.

Já o caractere número de colmos por metro não apresentou diferença na ordem dos clones em cana-planta, entretanto em cana-soca verificou-se diferença para todos os tratamentos correlacionados. No entanto, de forma geral não houve um padrão na resposta dos clones aos tratamentos. Este resultado pode ter sido em parte, provocado pelo fato de não haver repetição para os tratamentos utilizados e também devido ao grande número de fatores envolvidos nesse experimento.

Houve efeito dos tratamentos na estatura das plantas em cana-planta, mas o mesmo não foi observado em cana-soca, corroborando com a afirmação de Vitti (2005), de que o efeito de bactérias promotoras de crescimento é maior em cana-planta do que em cana-soca, o que poderia explicar a ausência de correlação encontrada para esse caractere em cana-soca. Essa afirmação também corrobora com Faroni (2004) que menciona que o sistema radicular em cana-planta é mais superficial e apresenta maior volume em relação à cana-soca, o que promoveria menor quantidade de exudatos nas raízes e menor interação com microrganismos em cana-soca. Os compostos de carbono exudados pela raiz são importantes no reconhecimento e início da associação planta-bactéria (KENNEDY, 1999; HARTMANN et al., 2008), dessa forma, quanto menor a quantidade de compostos exudados, menor associação, o que poderia explicar em partes os resultados obtidos.

Já o caractere massa média de 10 colmos apresentou diferença no *ranking*, sempre que foram comparados os clones inoculados com os não inoculados, característica que pode influenciar diretamente na produtividade da cultura, indicando que é importante a realização de mais estudos nesse sentido, tentando determinar quais os clones apresentaram resposta positiva e negativa à inoculação.

#### 6.4.2 Análise tecnológica

O resultado da análise tecnológica mostrou que o efeito para pureza e AR foram os mesmos para cana-planta e cana-soca. A pureza é um fator determinante para a qualidade do caldo na cana-de-açúcar, refletindo no rendimento. Dessa forma, os resultados obtidos são de grande importância, uma vez que mostraram que o tratamento influenciou o *ranking* dos clones para esse caractere. Pereira (2011) menciona que o papel da adubação nitrogenada na qualidade tecnológica da cana-de-açúcar é discutido por alguns autores, sendo que tanto o excesso como a falta de nitrogênio tem influência na qualidade tecnológica dos colmos. O mesmo autor também verificou aumento na pureza do caldo na cultivar SP80-3280 inoculadas com cinco espécies de PGPB (90,65%), quando comparado com plantas não inoculadas (88,25%).

Nesse sentido, mais análises devem ser realizadas tentando identificar quais os tratamentos que favoreceram o aumento da pureza e se a inoculação não promoveu efeito negativo, uma vez que na média, plantas inoculadas apresentaram menor quantidade de nitrogênio nas folhas que o controle (não inoculado).

O resultado observado para o AR em relação ao *ranking* dos clones também tem significativa importância, pois o AR é um fator que influencia na qualidade do caldo. Segundo Fernandes (2000) os açúcares redutores são precursores de cor no processo industrial de açúcar, isto é, intensificam a cor do açúcar, depreciando sua qualidade. Como os tratamentos tiveram efeito nesse parâmetro, mostrado pela diferença no *ranking*, é preciso conhecer em que condições (tratamento e clone) esse efeito foi positivo ou negativo.

Em relação ao caractere pol, foi observada diferença no ranqueamento dos clones somente em cana-planta, quando foram comparadas plantas inoculadas com IC26 em relação a plantas não inoculadas, e em cana-soca, quando foram comparados os clones tratados com IC26 com aqueles tratados com Triazo. Esse resultado mostra que houve menor influência do tratamento nesse parâmetro.

Já para fibra verificou-se que não houve resposta diferenciada dos clones em relação aos tratamentos, o que não foi observado em cana-soca. Pereira (2011) também observou diferença no teor de fibras de sete cultivares de cana-de-açúcar inoculadas com PGPB, sendo que apenas duas apresentaram resposta significativa, mostrando que este fator também pode ser afetado pela inoculação, sendo que esta resposta foi atribuída à correlação brix-fibra.

Pereira (2011) também encontrou valores diferentes para os demais caracteres tecnológicos das sete cultivares de cana-de-açúcar, quando comparou plantas inoculadas com

plantas não inoculadas, sendo que determinadas cultivares responderam positivamente à inoculação e outras de forma negativa, corroborando com os resultados do presente estudo.

Como pode ser observado, os clones não apresentaram um padrão de resposta entre as colheitas, cana-planta e cana-soca, tanto para caracteres biométricos quanto tecnológicos. Entretanto o baixo número de repetições pode ter influenciado na resposta, além de outros fatores ambientais envolvidos.

Sabe-se que a interação planta-bactéria é dependente do genótipo da planta, da espécie e estirpe da bactéria, da presença de outros microrganismos e das condições ambientais (BALDANI e BALDANI, 2005). Grande parte dos experimentos utilizando PGPB mostram resultados diferentes e, alguns fatores como tipo de solo em estudo, condições climáticas, ciclo da cultura, matéria orgânica, microrganismos, umidade do solo, entre outros estão envolvidos (BASHAN et al., 1995; MOREIRA e SIQUEIRA, 2006; MOUTIA et al., 2010). Fatores estes que não podem ser controlados em um experimento em campo, e que podem influenciar na resposta dependendo do ciclo da cultura e condições ambientais.

Dessa forma, mais estudos avaliando os efeitos da inoculação de PGPB em caracteres tecnológicos e biométricos, com maior número de repetições, são de grande importância para confirmar os resultados verificados no presente estudo.

#### 6.4.3 Análise de Nitrogênio

Os valores médios para os teores de nitrogênio nas folhas dos clones de cana-de-açúcar ( $13,3 \text{ g kg}^{-1}$ ) estão abaixo dos padrões mencionados como adequados, de 18 a  $25 \text{ g kg}^{-1}$  (RAIJ et al., 1996). Este resultado pode ser explicado pelo fato de que as plantas avaliadas não receberam nenhum tipo de adubação nitrogenada durante os dois ciclos de cultivo. Entretanto, esperava-se que plantas inoculadas com *A. brasilense* apresentassem valores superiores às plantas não inoculadas, o que não foi observado.

Ainda que a espécie *A. brasilense* não seja considerada a espécie preferencial para a fixação biológica de nitrogênio, os valores superiores para o teor de nitrogênio nas folhas em plantas não inoculadas ( $14,50 \text{ g kg}^{-1}$ ) não era esperado. Porém, não se verificou diferença significativa entre a média das plantas não inoculadas ( $14,50 \text{ g kg}^{-1}$ ) em relação às tratadas com IC26 ( $13,87 \text{ g kg}^{-1}$ ), que tem atividade constitutiva da nitrogenase (Tabela 7).

Baldani et al. (1987) também encontraram valores menores de nitrogênio (%) na palhada de trigo quando avaliaram plantas submetidas a dois níveis de adubação 15 e 60 kg

ha<sup>-1</sup>, inoculadas com um mix composto por *A. amazonense* (Cd) e *A. brasilense* (Sp7) (0,83 e 0,92, respectivamente), quando comparado com o controle não inoculado (0,85 e 1,00). Os autores atribuíram este resultado ao fato desta estirpe substituir a população nativa do solo e, conseqüentemente, aumentar a capacidade de desnitrificação, reduzindo a absorção de nitrogênio pela planta. Porém, no caso do presente estudo não foi observada diferença na população de bactérias quando se comparou plantas inoculadas e não inoculadas (Figura 2), bem como não foi avaliada a presença da bactéria em amostras puras de solo.

Entretanto, quando se observa os valores para cada clone de forma individual, verifica-se que alguns apresentaram melhor resposta que outros, indicando que pode haver o efeito do genótipo vegetal na absorção de nitrogênio e na resposta à inoculação. Esse resultado corrobora com muitos outros que também mostram diferença na resposta dos genótipos a inoculação com bactérias diazotróficas. Moutia et al. (2010) também verificaram teores de nitrogênio mais baixos nas raízes (36,7 mg), parte aérea (513,2 mg) e na planta toda (549,9 mg) da cv 570 de cana-de-açúcar inoculadas com *A. brasilense*, enquanto as plantas não inoculadas apresentaram valores de 48,5, 551,4 e 599,9 mg de nitrogênio nas raízes, parte aérea e planta inteira, respectivamente. No entanto, os mesmos autores verificaram teores maiores de nitrogênio nas raízes (33,5 mg), parte aérea (456,1 mg) e planta inteira (489,6 mg) em plantas inoculadas quando comparadas com as não inoculadas, 33,5 mg, 456,1 mg e 489,6 mg na raiz, parte aérea e planta inteira, respectivamente, quando avaliaram a cultivar M 1176/77.

Outro fator que pode ter influenciado nos resultados é que foi avaliado apenas o teor de nitrogênio nas folhas e não na planta inteira, uma vez que não foi realizada análise destrutiva. Normalmente os trabalhos com esse tipo de bactéria utilizam a análise da planta inteira (colmo e folhas) para estimar os teores de nitrogênio. Sendo assim, é possível que a concentração do nitrogênio nas outras partes da planta (colmo e raiz) tenha apresentado resultados diferentes.

Ainda poderia ser associado os teores de nitrogênio encontrados nas folhas com os teores de nitrogênio no solo, entretanto as amostras de solo coletadas antes e durante a condução do experimento mostraram homogeneidade nos teores desse elemento, tanto na camada de solo de 0-20 cm como na de 20-40 cm (Tabela 1). De qualquer forma, um maior número de repetições para cada clone e a análise em mais de um ciclo seria muito importante para confirmar os resultados obtidos.

#### 6.4.4 Comportamento da população das bactérias ao longo dos dois ciclos de cultivo

Geralmente espera-se uma redução da população de bactérias ao longo do tempo, após a inoculação e, principalmente, após o inverno (coletas realizadas no mês de julho). Muñoz-Roja e Caballero-Mellado (2003) verificaram uma redução na população de diferentes estirpes de *G. diazotrophicus* em 5 variedades de cana-de-açúcar, quando realizaram coletas aos 30, 60, 105 e 170 dias após a inoculação, o que não foi observado no presente estudo. Entretanto vale ressaltar que em seu trabalho, esses autores utilizaram plantas micropropagadas e condições ambientais controladas, diferentes daquelas utilizadas nesse trabalho.

Já Bashan et al. (1995), avaliando a sobrevivência de estirpes de *A. brasilense* (Sp245 e Cd) em 23 diferentes tipos de solo, não observaram redução significativa da população de bactérias 45 dias após a inoculação em plantas de trigo, concordando com os resultados obtidos no presente estudo. Porém, esses autores verificaram que na ausência da planta, a população foi reduzida de forma gradativa e significativa, sendo que a velocidade foi diferente para cada grupo de solo (região de origem) estudado. Os resultados obtidos em relação ao aumento e redução da população estão mais próximos dos observados por Reis Junior et al. (2000) que, avaliando a população nativa de *A. brasilense* em diferentes genótipos de cana-de-açúcar, verificaram valores diferentes dependendo da época do ano e do genótipo estudado, sendo que estes valores ficaram em torno de  $10^4$  a  $10^2$  cel.g<sup>-1</sup>.

Bashan et al. (2004) afirmam que populações em torno de  $10^5$  e  $10^6$  cel.g<sup>-1</sup> (5 e 6 log de cfu.g<sup>-1</sup> de tecido fresco, respectivamente) seja suficiente para promover os efeitos benéficos às plantas, valores estes maiores que os encontrados nos clones de cana-de-açúcar utilizados no presente estudo (4 e 5 log de cfu.g<sup>-1</sup> de tecido fresco, ou seja  $10^4$  e  $10^5$  cel.g<sup>-1</sup>). Essa diferença na população pode ser um dos motivos pelos quais não foi verificado um padrão na resposta dos clones estudados à inoculação, tanto para caracteres biométricos quanto para a resposta ao teor de nitrogênio, uma vez que esses níveis estão próximos àqueles encontrados em condições naturais (REIS JUNIOR et al., 2000).

#### 6.5 CONCLUSÕES

Os clones de cana-de-açúcar apresentam respostas diferenciadas de acordo com tratamento utilizado e ciclo, tanto para caracteres biométricos quanto para caracteres tecnológicos, e para o teor de nitrogênio nas folhas. A população de bactérias encontra-se

presente durante os dois ciclos de avaliação em concentração próxima a  $10^5$  em todos os tratamentos. Não há diferença significativa na população para os tratamentos e tecidos avaliados, rizoma e raíz.

## 6.6 REFERÊNCIAS

- BALDANI, V. L. D.; BALDANI, J. I.; DOBEREINER, J. 1987 Inoculation of field-grown wheat (*Triticum aestivum*) with *Azospirillum* spp. in Brazil. *Biology and Fertility of Soils*, v.4, p.37-40.
- BALDANI, I. J.; BALDANI, L. V. 2005 History on the biological nitrogen fixation research in graminaceous plants: special emphasis on the Brazilian experience. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, v.77, p.549-579. PMID:16127558
- BASHAN, Y., HOLGUIN, G.; DE-BASHAN, L. E. 2004 *Azospirillum*–plant relationships: physiological, molecular, agricultural and environmental advances (1997–2003). *Canadian Journal of Microbiology*, v.50, p.521–577. PMID:15467782.
- BASHAN, Y.; PUENTE, M. E.; RODRIGUEZ-MENDOZA, M. N.; TOLEDO, G.; HOLGUIN, G.; FERRERA-CERRATO, R.; PEDRIN, S. 1995 Survival of *Azospirillum brasilense* in the Bulk Soil and Rhizosphere of 23 Soil Types. *Applied and Environmental Microbiology*, v.61, p.1938–1945.
- CARVALHO, T. L. G.; FERREIRA, P. C. G., HEMERLY, A. S. 2011 Sugarcane Genetic Controls Involved in the Association with Beneficial Endophytic Nitrogen Fixing Bacteria. *Tropical Plant Biology*, v.4, p.31–41.
- CRONQUIST, A. 1981 An integrated system of classification of flowering plants. Columbia University Press, New York, 1262p.
- DÖBEREINER, J.; BALDANI, V. L. D.; BALDANI, J. I. 1995 Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não leguminosas. Brasília: Embrapa-SPI, 60p.
- EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUARIA (Embrapa) 1999 Sistema Brasileiro de classificação de solos. Brasília, 412p.
- FARONI, C. E. Sistema radicular de cana-de-açúcar e identificação de raízes metabolicamente ativas. Dissertação de Mestrado, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, São Paulo, 86p., 2004.
- FERNANDES, A. C. 2000 Cálculos na Agroindústria da cana de açúcar. Piracicaba, STAB: Açúcar, Álcool e Subprodutos, 193p.
- FERREIRA, F. M.; BARBOSA, M. H. P.; CASTRO, R. D.; PATERNELLI, L. A.; CRUZ, C. D. 2005b Effects of inbreeding on the selection of sugar cane clones. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, Brasil, v.5 p.174-182,

FUENTES-RAMIREZ, L. E.; CABALLERO-MELLADO, J.; SEPÚLVEDA, J.; MARTINEZ-ROMERO, E. 1999 Colonization of sugarcane by *Acetobacter diazotrophicus* is inhibited by high N-fertilization. FEMS Microbiology Ecology, v.29, p.117-128.

HARTMANN, A.; SCHMID, M.; VAN TUINEN, D.; BERG, G. 2008 Plant-driven selection of microbes. Plant and Soil, v.321, p.235-257. DOI: 10.1007/s11104-008-9814-y.

KENNEDY, A. C. 1999 Bacterial diversity in agroecosystems. Agriculture, Ecosystems & Environment, v.74, p.65-76.

INSTITUTO AGRONÔMICO DO PARANÁ (IAPAR) 1994 Cartas Climáticas do Estado do Paraná. Instituto Agronômico do Paraná, Londrina, 49p.

LEITE, M. S. O.; PETERNELLI, L. A.; BARBOSA, M. H. P. 2006 Effects of plot size on the estimation of genetic parameters in sugarcane families. Crop Breeding and Applied Biotechnology, Brasil, v.6, p.40-46.

LOPES, V. R.; BESPALHOK FILHO, J. C.; ARAUJO, L. M.; RODRIGUES, F. V.; DAROS, E.; OLIVEIRA, R. A. 2012 The selection of sugarcane families that display better associations with plant growth promoting rhizobacteria. Journal of Agronomy, v.11, p.43-52. DOI: 10.3923/ja.2012.43.52

MARIN, V. A.; BALDANI, V. L.; TEIXEIRA, K. R. S.; BALDANI, J. I. 1999 Fixação biológica de nitrogênio: bactérias fixadoras de nitrogênio e sua importância para a agricultura tropical. Disponível em <[http://www.cnpab.embrapa.br/publicacoes/fbn\\_ao\\_leg.html](http://www.cnpab.embrapa.br/publicacoes/fbn_ao_leg.html)>. Acesso em novembro de 2010.

MATSUOKA, S.; GARCIA, A. A. F.; ARIZONO, H. 2005 Melhoramento da cana-de-açúcar. In: BOREM, A. Melhoramento de espécies cultivadas. Viçosa: Editora UFV, p.205-251. MAULE, R. F.; MAZZA, J. A.; MARTA JR., G. B. 2001 Produtividade agrícola de cultivares de cana-de-açúcar em diferentes solos e épocas de colheita. Scientia Agrícola, v.58, p.295-301.

MELO, L. J. O.; OLIVEIRA, F. J.; BASTOS, G. Q.; FILHO, C. J. A.; REIS, O. V. 2006 Interação genótipo x ciclos de colheita de cana-de-açúcar na Zona da Mata de Pernambuco. Bragantia, Campinas, v.65, p.197-205.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. Microbiologia e Bioquímica do Solo. 2006. 2 ed., Editora UFLA, 729p.



MOUTIA, J. F. Y.; SAUMTALLY, S.; SPAEPEN, S.; VANDERLEYDEN, J. 2010 Plant growth promotion by *Azospirillum* sp. in sugarcane is influenced by genotype and drought stress. *Plant and Soil*, v.337, p.233–242. DOI: 10.1007/s11104-010-0519-7.

MUÑOS-ROJAS, J. CABALLERO-MELLADO, J. 2003 Population dynamics of *Gluconacetobacter diazotrophicus* in sugarcane cultivars and effect on plant grow. *Microbial Ecology*, v.45, p.454-464.

NOGUEIRA, E. DE M.; VINAGRE, F.; MASUDA, H. P.; VARGAS, C.; PÁDUA V. L. M.; SILVA, F. R.; SANTOS R. V.; BALDANI J. I.; CAVALCANTI, P.; FERREIRA G.; HEMERLY A. S. Expression of sugarcane genes induced by inoculation with *Gluconacetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum rubrisubalbicans*. *Genetics and Molecular Biology*, v.24 (1-4), p.199-206, 2001.

PEREIRA, W., 2011 Produtividade e qualidade tecnológica da cana-de-açúcar inoculada com bactérias diazotróficas. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Curso de Pós-Graduação em Agronomia. 70p.

RAIJ, B. V.; CANTARELLA, H.; QUAGGIO, J. A.; FURLAN, A. M. C. 1996 Recomendações de adubação e calagem para o Estado de São Paulo. 2ª Edição, Campinas – Instituto Agrônomo: Fundação IAC, 285p.

RAIJ, B. V.; CANTARELLA, H. 1997 Outras culturas industriais. In: RAIJ, B.van; CANTARELLA, H.; QUAGGIO, J. A. & FURLANI, A. M. C., eds. Recomendações de adubação e calagem para o Estado de São Paulo. Campinas, Fundação IAC, p.233-243.

REIS JÚNIOR, F. B.; SILVA, L. G.; REIS, V. M.; DOBEREINER, J. 2000 Ocorrência de bactérias diazotróficas em diferentes genótipos de cana-de-açúcar. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.35, p.985-994.

VINAGRE, F.; VARGAS, C.; SCHWARCZ, K.; CAVALCANTE, J.; NOGUEIRA, E. M. 2006 SHR5: A novel plant receptor kinase involved in plant-N<sub>2</sub>-fixing endophytic bacteria association. *Journal of Experimental Botany*, v.57, n.3, p.559–569. DOI: 10.1093/jxb/erj041.

VITTI, G. S.; QUEIROZ, F. E. C.; OTTO R.; QUINTINO, T. A. Nutrição e adubação da cana-de-açúcar. Bebedouro, SP, 2005. 78 p. Disponível em: [http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Repositorio/Nutricao+cana+GVitti\\_000fh3r3vzp02wyiv80rn0etnmc6zamd.pdf](http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Repositorio/Nutricao+cana+GVitti_000fh3r3vzp02wyiv80rn0etnmc6zamd.pdf) > Acesso em: Dez. 2012.

## 7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo demonstrou que houve interação significativa entre as famílias de cana-de-açúcar estudadas e as PGPB utilizadas, em fases iniciais do programa de melhoramento genético de cana-de-açúcar, e que a magnitude desta interação depende também do caractere estudado e do ciclo avaliado.

O caractere brix mostrou ser o mais indicado no estudo da interação de plantas na fase inicial de seleção (T1). Entretanto, quando foi avaliado o efeito do brix em clones na fase mais avançada (T2 adiantado) o resultado não se repetiu, pois não foi observada diferença no *ranking* das plantas quando estas foram submetidas aos diferentes tratamentos, como era esperado.

Sendo assim, mais estudos seriam necessários para avaliar essa interação. É necessário, ainda, se avaliar o efeito genético e ambiental nos resultados obtidos, uma vez que em T1 a variabilidade genética é alta.

O número de famílias utilizadas nos Experimentos 1 e 2 foi muito alto, dificultando a avaliação e a realização de um maior número de análises. Outro fator a ser mencionado é que o número de indivíduos por família foi baixo, diminuindo a representatividade de cada família. Dessa forma, o efeito genético pode ter sido confundido com o efeito do tratamento, devido à pequena quantidade de indivíduos por família associadas à alta variabilidade genética nessa fase.

Nesse sentido, sugere-se a redução do número de famílias e o aumento do número de repetições a serem utilizadas para facilitar o estudo da interação.

Na etapa seguinte de seleção (T2 adiantado), os clones selecionados apresentaram respostas diferenciadas de acordo com tratamento, característica avaliada e ciclo da cultura. A população de bactérias esteve presente durante os dois ciclos estudados, em concentração adequada ( $10^5$  cfu g<sup>-1</sup>), em todos os tratamentos e nos diferentes tecidos avaliados.

Nessa segunda etapa o número de repetições também não foi o ideal. O número de repetições ficou reduzido para cada clone e não houve repetição para o mesmo clone em cada tratamento. Isso dificultou a análise dos dados, mostrando variação nos valores dos caracteres avaliados para o mesmo clone. Por este motivo, não foi possível analisar se, o resultado obtido

em T1, em família, repetiu-se em T2 (adiantado), nos clones. Nesse sentido, também se recomenda o aumento do número de repetições nessa fase e o aumento do número de indivíduos (clones) por família em outros trabalhos.

Outra possibilidade nesse tipo de estudo seria o direcionamento de cruzamentos usando cultivares comerciais, que já mostraram ser responsivas à inoculação com PGPB, e avaliar a resposta das progênes provenientes desses cruzamentos, e posterior comparação dos clones selecionados com os pais quanto à resposta a inoculação. Também poderiam ser utilizadas plantas modelo como controle, como a Chune ( *Saccharum barberi* Jeswiet) considerada pouco responsiva e Krakatau (*Saccharum spontaneum*), considerada responsiva.

Em relação aos inoculantes utilizados, alguns fatores podem ter influenciado nos resultados, principalmente os ambientais, como a microbiota nativa, que em alguns casos pode ser prejudicial ao estabelecimento das espécies inoculadas. Ambos inoculantes já foram utilizados em experimentos *in vitro*, em casa de vegetação e a campo. O inoculante a base de *Azospirillum brasilense* já foi utilizado em vários experimentos na cultura do milho, mas pouco utilizado em cana-de-açúcar, enquanto o mix da Embrapa é específico para a cultura da cana-de-açúcar. Entretanto, como observado nos resultados do presente estudo, o inoculante a base de *A. brasilense* mostrou-se mais eficiente na promoção do crescimento em relação ao mix. Nesse sentido, a determinação do inoculante a ser usado também é um fator importante, sendo necessários mais estudos nesse sentido.

Ainda pode ser mencionado que nas condições onde foi realizado o presente estudo, não foi possível verificar se as bactérias presentes nas amostras coletadas eram as mesmas inoculadas. Sabe-se que o reisolamento das bactérias inoculadas em plantas em experimentos de campo é uma tarefa difícil, ainda mais pela existência de bactérias nativas no solo, muitas vezes da mesma espécie. Vários trabalhos foram desenvolvidos usando-se bactérias marcadas ou transformadas por genes marcadores, com o objetivo de verificar a presença das mesmas nos tecidos vegetais. Dessa forma, esta técnica poderia ser uma eficiente solução na análise da sobrevivência das bactérias no campo e nos tecidos vegetais.

O acompanhamento da população ao longo do ciclo da cultura, inclusive após o corte em cana-planta e na rebrota, também seria um fator que poderia explicar as diferentes respostas em cana-planta e cana-soca, bem como a diferença observada em diferentes clones e na eficiência dos inoculantes, também sendo sugerida.

Em relação ao nitrogênio, embora ainda não exista uma análise padrão para determinar a quantidade de nitrogênio efetivamente fixado de forma biológica, a análise da concentração de nitrogênio nos tecidos vegetais é recomendada. Mesmo que a FBN não seja mais

considerada como sendo o único benefício promovido por essas bactérias, a maximização desta ainda é de grande interesse. Dessa forma, sugere-se que na análise do teor de nitrogênio seja utilizada a planta inteira, para que seja avaliado o teor total desse elemento. Também é recomendado o cálculo do balanço de nitrogênio no sistema, para auxiliar na compreensão da resposta das plantas, e sem desconsiderar o teor do nitrogênio presente em outras formas (mineral, orgânica, etc.).

De forma geral, sugere-se que a repetibilidade dos resultados seja maximizada, e as metodologias aperfeiçoadas, para que em próximos estudos sejam obtidos resultados mais conclusivos, dando novos subsídios ao melhoramento de cana-de-açúcar, visando maior resposta a FBN e a associação com PGPB.

## **ANEXO I**

Artigo publicado na Revista Journal of Agronomy

## The Selection of Sugarcane Families That Display Better Associations with Plant Growth Promoting Rhizobacteria

<sup>1</sup>Valeria Rosa Lopes, <sup>2</sup>Joao C. Bessalho-Filho, <sup>3</sup>Luiza Maria de Araujo,  
<sup>4</sup>Fabio Vieira Rodrigues, <sup>5</sup>Edelclaiton Daros and <sup>5</sup>Ricardo Augusto Oliveira  
<sup>1</sup>Department of Plant Science and Crop Protection, Federal University of Parana,  
 Funcionarios Street, 1540, Curitiba, Parana, Brazil  
<sup>2</sup>Plant Science/UFPR, Curitiba, Parana, Brazil  
<sup>3</sup>Biochemistry/UFPR, Curitiba, Parana, Brazil  
<sup>4</sup>UNIPAR, Paranavai, Parana, Brazil  
<sup>5</sup>Plant Science/UFPR, Curitiba, Parana, Brazil

**Abstract:** The capacity of the sugarcane plant to respond to Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) is associated with both the efficiency of the bacterial strain and the capacity of the plant to respond to inoculation. For this reason, the appropriate selection of both the bacterial strain and the sugarcane genotype is required for generating optimal results from PGPR inoculations. To address this issue, this study sought to evaluate the response of 54 sugarcane families to inoculation with *Azospirillum brasilense* strains. In particular, four months after germination, 54 families from crosses between clones of sugarcane were treated either with an inoculant named Triazo, which was composed of a mixture of the Abv5, Abv6 and Abv7 strains of *A. brasilense*, or with the IC26 strain of *A. brasilense*. The treated plants were then planted in fields. These plants were assessed 14 months after they had been planted on the basis of various productivity parameters. Significant differences among the inoculants were observed for stalk length, stalk diameter and Brix. Significant interactions between the families and bacteria occurred with respect to stalk diameter and Brix; the interaction coefficients could have either positive (0.7272 for Brix and 0.4061 for stalk diameter) or negative (-0.5514 for Brix and -0.1858 for stalk diameter) values, depending on the family and the inoculant that were considered. Therefore, the inoculation of the seedling in the first phase of selection is recommended for a sugarcane breeding program that seeks to select genotypes with better responses to PGPR inoculation.

**Key words:** Plant-bacteria interaction, PGPR, plant breeding, *Azospirillum brasilense*, nitrogen-fixing bacteria

### INTRODUCTION

The genus *Azospirillum* contains the most extensively studied Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR), which are known to enhance the yield of different crop plants (Bashan and Holguin, 1997). The *Azospirillum brasilense* species is considered to be a rhizobacterium (Broek *et al.*, 1993; Assmus *et al.*, 1995) that engages in associative symbiosis with various host plants (Bashan *et al.*, 2004). The species was first described as *Spirillum lipoferum* (Dobereiner and Day, 1976) and was subsequently reclassified as *Azospirillum brasilense* in 1978 (Tarrand *et al.*, 1978); since 1978, it has been studied for its capacity to fix nitrogen (Bashan and Bashan, 2011).

In addition to nitrogen fixation, these bacteria may also provide other beneficial biological effects to plants (Bashan *et al.*, 1990; Verma *et al.*, 2010), such as

increasing phytohormone activity, promoting root system proliferation, enhancing the water and mineral uptake of the plant, solubilizing phosphates and mobilizing minerals. Recently, other mechanisms have also been discovered and attributed to this bacterium, including the sorting of small molecules and enzymes, the enhancement of membrane activity and proton efflux, the direct and indirect biological control of numerous phytopathogens and the mitigation of environmental stressors of plants, such as salt (Bashan and Bashan, 2011) and drought stress (Arzanesh *et al.*, 2009).

For these reasons, research has been conducted that seeks to select more effective strains of Plant Growth Promoting Bacteria (PGPB) (Schloter and Hartmann, 1998; Shaukat *et al.*, 2006; Hungria *et al.*, 2010; Keyeo *et al.*, 2011). However, the results of this research demonstrated that the capacity of PGPB strain to fix nitrogen and promote plant development is variable

(Bashan and Levanony, 1990) and certain results emphasize that the necessity to select not only the bacteria strain but also the plant genotype (Munos-Rojas and Caballero-Mellado, 2003; De Oliveira *et al.*, 2006).

The interactions between plants and bacteria depend on the plant genotype, the species and strain of bacteria that are involved, the presence of other microorganisms and the environmental conditions (Baldani and Baldani, 2005; Oliveira *et al.*, 2009). Various experiments have emphasized that the plant genotype exerts an important effect on the plant-bacteria interaction. However, few investigations have been conducted with the aim of selecting gramineous plant genotypes that respond well to inoculation with PGPB, although, this topic has been addressed in the context of maize (De Mendonça *et al.*, 2006), wheat (Sala *et al.*, 2007) and rice (Ladha *et al.*, 1987).

At present, PGPB-related studies of sugarcane are focused on evaluating the responses of commercial varieties to inoculation with PGPB (Coelho *et al.*, 2003; Hari and Srinivasan, 2005). The selection of genotypes that have positive interactions with the bacteria is not a primary objective of sugarcane breeding programs.

However, the acquisition of knowledge regarding the different responses of sugarcane families to inoculation with PGPR during the initial phase of sugarcane breeding, which features greater genetic variability, can facilitate an understanding of the nature and magnitude of these interactions. This understanding can help researchers structure future studies and breeders plan new strategies of selection. Thus, the purpose of this study was to assess the responses of different sugarcane crosses

(families) to inoculation with *A. brasilense* in the initial phase of a sugarcane breeding program, thereby allowing for the selection of the most responsive families.

## MATERIALS AND METHODS

**Site description and field management:** The experiment was conducted at the Paranavai Experimental Station of the Federal University of Paraná (UFPR), in the city of Paranavai/PR, Brazil (23°05'S, 52°27'W, altitude 503 m), during 2009 and 2010. According to Köppen's classification system, the climate type at the experimental station is Cfa (IAPAR 1994). The soil in the experimental station is classified as a Ferralsol (Dystric) (FAO, 2006). The main chemical characteristics of the soil at the start of the experiment are illustrated in Table 1.

**Plant material:** This study used seeds (caryopses) from 53 biparental crosses and one polycross between sugarcane clones; these crosses were performed in the "Serra do Ouro" Crossing Station in 2008 (Table 2). The seeds were germinated in November 2008 in a greenhouse with controlled irrigation and temperature (30°C±2), using plastic trays containing Plantmax® as a substrate.

At 30 days after sowing, the seedlings were transplanted to individual cells (60 cm<sup>3</sup>) in Styrofoam trays which were left in the shade (50%). At four months after sowing, the plants were first treated with *A. brasilense* inoculants, then left in the shade (50%) for seven additional days and subsequently transplanted to the field (the first phase of a sugarcane breeding program).

Table 1: The chemical properties of the soils (0-40 cm) used in this experiment

pH (CaCl <sub>2</sub> )	Al cmol <sub>c</sub>	H+Al (dm <sup>-3</sup> )	Ca	Mg	K	CEC	T <sub>CEC</sub>	BS (%)	N	C (g dm <sup>-3</sup> )	P
6.45	0.00	2.025	0.65	0.95	0.02	3.59	1.58	43.57	0.10	11.97	10.72

CEC: Cation exchange capacity = H+Al+Ca+Mg+K, Total CEC: T<sub>CEC</sub> = Ca+Mg+K BS: Base saturation = (T<sub>CEC</sub>/CEC)×100

Table 2: The relationships of the parents and crosses (female×male) that produced the 54 sugarcane families studied in this experiment

Family	Cross (female×male)	Family	Cross (female×male)	Family	Cross (female×male)
1	H64-1881×RB92579	19	RB99386×SP79-2313	37	RB867515×RB977619
2	SP83-5073×RB92579	20	RB813804×RB72910	38	RB855511×RB92606
3	RB951560×RB867515	21	RB977625×RB008004	39	RB966928×RB935845
4	RB01616×H64-1881	22	RB040826×RB855035	40	SP83-2847×RB855546
5	RB99386×SP91-1049	23	RB855002×RB93509	41	RB855536×RB925268
6	RB001922×RB92579	24	RB966922×polycross	42	RB855063×SP77-5181
7	RB93509×RB845257	25	RB961012×RB931011	43	RB855113×SP77-5181
8	RB977662×RB92579	26	RB011579×RB991555	44	RB925345×RB935686
9	RB845210×RB931003	27	RB977619×RB867515	45	RB72454×RB951019
10	RB011579×RB92579	28	SP80-1842×RB98710	46	SP77-5181×RB855113
11	RB832847×RB845210	29	RB99361×RB98710	47	RB845210×SP83-2847
12	RB956911×RB93509	30	RB931003×RB855336	48	SP85-3877×RB931565
13	RB021698×RB977625	31	H69-4234×RB01616	49	RB955114×RB845197
14	RB925378×SP80-185	32	RB01616×H69-4234	50	RB855546×RB925276
15	RB008309×RB974115	33	RB040811×RB845197	51	H64-1881×RB01616
16	RB99382×RB98710	34	RB951541×RB947520	52	RB99386×SP79-2313
17	RB69758×SP93-1322	35	RB965505×SP70-1143	53	RB92579×H64-1881
18	RB98347×RB98710	36	RB92606×H56-6724	54	RB971765×RB93509

**Strains of bacteria:** The *A. brasilense* strains Abv5, Abv6, Abv7 and IC26 were supplied by the UFPR Department of Biochemistry and Molecular Biology, Curitiba, Parana. The Abv5, Abv6 and Abv7 strains were isolated from maize (Hungria *et al.*, 2010), whereas the IC26 strain is a natural mutant with constitutive nitrogenase activity. All four of these strains are diazotrophs. The Abv5 and Abv6 strains produce indoleacetic acid (IAA) and are capable of reducing acetylene to ethylene *in vitro* (Pedrinho *et al.*, 2010).

**Inoculants:** The *A. brasilense* strains were cultivated separately in NFB media (4.0 g L<sup>-1</sup> KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 6.0 g L<sup>-1</sup> K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.2 g L<sup>-1</sup> MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.1 g L<sup>-1</sup> NaCl, 0.2 g L<sup>-1</sup> CaCl<sub>2</sub>, 0.056 g L<sup>-1</sup> nitrilotriacetic acid, 0.2 g L<sup>-1</sup> FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 1.0×10<sup>-4</sup> g L<sup>-1</sup> biotin, 0.002 g L<sup>-1</sup> Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O, 0.00235 g L<sup>-1</sup> MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O, 0.0028 g L<sup>-1</sup> H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 8.0×10<sup>-5</sup> g L<sup>-1</sup> CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O and 2.4×10<sup>-4</sup> g L<sup>-1</sup> ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O) at 30°C (optical density: 1.5-1.8) for 48 h. In total, 5 mmol L<sup>-1</sup> glutamate was used as a nitrogen source and 0.5% of sodium lactate was used as a carbon source. After being autoclaved, these two reagents were added to cold medium and the pH of this medium was adjusted to 6.8. After the bacterial strains had grown, they were added to polyvinyl pyrrolidone (PVP) solution at 5%. The strains Abv5, Abv6 and Abv7 were mixed to form one inoculant named Triazo. The IC26 strain was used separately and constituted another inoculant for this experiment.

**Inoculation:** Plants from each family were subjected to one of the following treatments: no inoculation (T0); inoculation with the IC26 strain of *A. brasilense* (1×10<sup>10</sup> bacteria mL<sup>-1</sup>) (T1); or inoculation with Triazo (3×10<sup>9</sup> bacteria mL<sup>-1</sup>) (T2).

The inoculations were performed four months after sowing; at this time, the plants were still in trays. A total of 100 µL of the appropriate inoculant (at the aforementioned concentrations) was applied to the base of each plant with a micropipette.

**Experimental design and planting:** The experiment had a completely randomized block design with three replicates and a split-plot arrangement of treatments. Each block consisted of 54 parcels and one family was planted in each parcel. A parcel consisted of three rows, each of which was 5 m in length and contained 10 plants; each row was subjected to a different inoculation treatment (T0, T1 or T2). The space between lines was 1.4 m between rows and 0.5 m between plants and the total experimental area was 5000 m<sup>2</sup>. The RB986419 sugarcane cultivar was used as a side border for this area.

The planting was conducted in February 2009. Fertilization was conducted in the furrows; in particular, each row (5 m in length) received 540 g of potassium chloride and 180 g of ordinary superphosphate but no additional nitrogen. In accordance with the standard procedures for sugarcane cultivation, the plants were treated with pre-emergence herbicides and post-emergence weeding but were not irrigated.

**Evaluation:** The evaluation of the plants was conducted 14 months after planting and the following parameters were evaluated: the number of stalks per plant, the average length of the stalk (the number of meters between the first leaf with clearly visible dewlap and the bottom of the stalk), the average diameter of the stalk (at the third internode from the bottom) and Brix.

**Statistical analysis:** The data for all of the evaluated parameters were analyzed using the Selegen REML/BLUP software package (De Resende, 2006) to determine statistically significant differences among the families, the bacterial treatments and the interactions between the bacteria and the plants. This software estimated the components of variance and the prediction of genetic values using the restricted maximum likelihood/best linear unbiased prediction (REML/BLUP) procedure. The statistical model used is provided below:

$$y = Xa + Zb + Wp + Qr + T(axb) + e,$$

where, *y* is the data vector, *a* is the vector representing factor A effects (assumed as fix, allocated to the plots) added to general mean; *b* is the genotypic effect vector associated with the sub-plot in question (representing the magnitude of factor B within the context of factor A; this magnitude is assumed to be random); *p* is the parcel effect vector, that is, the error associated with the interaction of factor A with the replication factor (this interaction is assumed to be random); *r* is the block effect vector or replication factor (assumed to be random); *a* × *b* is the vector representing the genotype×factor A interaction (also random); and *e* is the residual vector or error vector (random, once again). The capital letters (*X*, *Z*, *W*, *T* and *S*) represent the incidence matrices for referred effects (De Resende, 2006).

## RESULTS

The results of the deviance analysis, obtained using the REML/BLUP procedure, are similar to the variance analyses. However, the former methodology enables better accuracy because it predicts genotypic values



Table 3: The results of the deviance analysis for the following characteristics: The number of stalks (NSP), the average length of the stalk (ALS), the average diameter of the stalk (AD) and the average Brix after 14 months

Effects	Characteristics (F value)			
	NS	ALS	AD	Brix
Family	28.30***	9.04***	13.17***	41.89***
Treatment	0.00 <sup>ns</sup>	16.96***	9.07***	30.77***
Block	6.54**	53.51***	24.77***	17.21***
Interaction family×treatment	2.11 <sup>ns</sup>	2.09 <sup>ns</sup>	2.97*	25.92***
CV%	18.88	7.79	6.48	4.37

\*\*\*Significance at the 1% level (6.63), \*\*Significance at the 5% level (3.84), \*Significance at the 10% level (2.71), ns: Non significant

Table 4: The results of the treatments for the following characteristics: The number of stalks (NS), the average length of the stalk (ALS), the average diameter of the stalk (AD) and the average Brix after 14 months

Treatment	Average of each characteristic			
	NS <sup>ns</sup>	ALS (m)***	AD (cm)***	Brix***
Non-inoculated	8.942	2.279	2.309	19.119
Triazo	8.705	2.285	2.332	18.954
IC26 strain	9.037	2.298	2.340	19.208

\*\*\*Significance at the 1% level (6.63), ns: Non significant

instead of phenotypic values, thereby decreasing the impact of environmental factors on the results. The deviance analysis allows for the analysis of experiments that are unbalanced due to lost parcels or repetition. For this reason, the deviance analysis is recommended for sugarcane breeding assessments, particularly for family studies conducted in the initial phases of selection.

The results of the deviance analysis (Table 3) demonstrated that there were significant differences among the families for all of the parameters at a 1% significance level, indicating the high genetic variability present in this selection phase of a sugarcane breeding program.

The distinct bacterial treatments examined in this study demonstrated significantly different effects (at a 1% significance level) for the parameters of stalk length, stalk diameter and Brix (Table 4). In particular, the plants treated with IC26 possessed the greatest diameter (2.340 cm), whereas the plants treated with Triazo had greater diameters (2.332 cm) than the control plants (2.309 cm). A somewhat contrasting result was observed for the Brix variable, as greater values of Brix were presented by the plants that were not inoculated (19.119) than by the plants that received the Triazo treatment (18.954); however, the plants treated with IC26 produced the highest value of Brix (19.208) (Table 4). The plants inoculated with IC26 also had the longest stalks (2.298 cm); the stalk length was greater in the plants treated with Triazo (2.285 cm) than in the control (2.279 cm).

These results indicated that except for the negative effect produced by the Triazo inoculant on Brix, the inoculation of the sugarcane with *A. brasilense* positively influenced all of the studied parameters.

Although, the blocks were randomized, there was a significant difference in the block effect for all of the

analyzed variables, indicating that the plant growth was influenced by the soil composition and the light that was received by the plants. Given that the soil used in field experiments is not homogeneous, this result was an expected outcome; moreover, the low values of the coefficient of variation for this block effect indicated that the experimental precision of this study was adequate.

The interaction effects for the examined sugarcane families differed significantly for the parameters of Brix (at a 1% significance level) and average stalk diameter (at a 10% significance level), indicating that the response to inoculation varied with respect to the sugarcane family that was tested (Table 6). However, the other parameters that were examined did not present significant differences due to this interaction effect.

The 10 best-performing families for each assessed parameter are illustrated in Table 5; unsurprisingly, the order of the studied families differs depending on the variable that is being evaluated. The plants of families 43 (RB855113×SP77-5181), 50 (RB855546×RB925276), 30 (RB931003×RB855336), 6 (RB001922×RB92579), 8 (RB977662×RB92579) and 2 (SP83-5073×RB92579) were among the best for more than one parameter.

In Fig. 1a, the averages of the Brix parameter for each treatment are illustrated. As this graphic demonstrates, the average of this trait changed for all treatments in accordance with the family that was examined, indicating that inoculation can promote either negative or positive family-dependent effects on productivity. For instance, the control samples of family 6 (RB001622×RB92579) presented the highest Brix values, whereas lower values of Brix were observed in the samples that were inoculated with Triazo and IC26. By contrast, the control samples of Brix were observed in the samples that were inoculated with Triazo and IC26. By contrast, the control samples of

**Table 5:** The genotypic value (GV) of the 10 best families with respect to the following characteristics: The number of stalks (NS), the average length of the stalk (ALS), the average stalk diameter (AD) and the average Brix at 14 months after planting

Characteristics evaluated after 14 months								
Order	NS		ALS		AD		Brix	
	Family	GV <sup>1</sup>	Family	GV	Family	GV	Family	GV
1	30	12.485 <sup>a2</sup>	20	2.437 <sup>a</sup>	43	2.482 <sup>a</sup>	3	20.671 <sup>a</sup>
2	43	11.186 <sup>a</sup>	27	2.412 <sup>a</sup>	8	2.466 <sup>a</sup>	2	20.658 <sup>a</sup>
3	46	10.983 <sup>a</sup>	11	2.401 <sup>a</sup>	38	2.458 <sup>a</sup>	6	20.466 <sup>a</sup>
4	31	10.964 <sup>a</sup>	6	2.386 <sup>a</sup>	32	2.436 <sup>a</sup>	12	20.298 <sup>a</sup>
5	16	10.840 <sup>a</sup>	25	2.383 <sup>a</sup>	50	2.435 <sup>a</sup>	5	20.219 <sup>a</sup>
6	45	10.626 <sup>b</sup>	17	2.382 <sup>a</sup>	30	2.422 <sup>a</sup>	24	20.100 <sup>a</sup>
7	44	10.563 <sup>b</sup>	43	2.373 <sup>a</sup>	2	2.420 <sup>a</sup>	26	20.059 <sup>a</sup>
8	47	10.319 <sup>b</sup>	10	2.369 <sup>a</sup>	4	2.412 <sup>a</sup>	37	20.027 <sup>a</sup>
9	50	10.247 <sup>b</sup>	8	2.357 <sup>a</sup>	54	2.410 <sup>a</sup>	42	20.011 <sup>a</sup>
10	41	9.939 <sup>b</sup>	50	2.355 <sup>a</sup>	52	2.397 <sup>a</sup>	14	19.989 <sup>a</sup>

Using student's t-test, numbers followed by the same letter in each column do not differ statistically at the 1% significance level

**Table 6:** Summary of the ten best families (with respect to genotypic value) for the characteristics of average Brix and average stalk diameter, as well as the corresponding value of family-treatment (F×T) interactions, at 14 months after planting

Order	Average stalk diameter <sup>a</sup>		Brix <sup>***</sup>	
	F×T	Interaction value	F×T	Interaction value
1	43×T0	-0.0034	1×T0	0.3819
1	43×IC26	0.0254	1×IC26	0.0699
1	43×TRIAZO	0.0251	1×TRIAZO	-0.5514
2	8×T0	0.4061	2×T0	0.213
2	8×TRIAZO	-0.1858	2×IC26	0.0897
2	8×IC26	0.0047	2×TRIAZO	0.1451
3	38×T0	0.0249	6×T0	0.7272
3	38×IC26	0.045	6×IC26	-0.2932
3	38×TRIAZO	-0.0301	6×TRIAZO	-0.0413
4	32×T0	0.0061	4×T0	-0.5045
4	32×IC26	0.0324	4×IC26	0.4341
4	32×TRIAZO	-0.0054	4×TRIAZO	0.073
5	50×T0	0.0224	5×T0	-0.1036
5	50×IC26	0.0225	5×IC26	0.1383
5	50×TRIAZO	-0.0121	5×TRIAZO	0.2874
6	30×T0	0.0059	24×T0	0.4156
6	30×IC26	-0.0021	24×IC26	-0.4265
6	30×TRIAZO	0.025	24×TRIAZO	0.2991
7	2×T0	0.013	26×T0	0.1798
7	2×IC26	0.0056	26×IC26	0.1862
7	2×TRIAZO	0.0206	26×TRIAZO	-0.0898
8	40×T0	0.0056	37×T0	-0.4287
8	40×IC26	-0.0042	37×IC26	0.6071
8	40×TRIAZO	0.0054	37×TRIAZO	0.0886
9	9×T0	-0.0209	9×T0	-0.0968
9	9×IC26	0.0239	9×IC26	-0.0461
9	9×TRIAZO	-0.0229	9×TRIAZO	0.3047
10	52×T0	0.0119	10×T0	-0.0146
10	52×IC26	-0.0118	10×IC26	0.289
10	52×TRIAZO	0.0211	10×TRIAZO	-0.202

\*\*\*Significant at the 1% level (6.63), \*Significant at the 10% level (2.71)

family 37 (RB867515×RB977619) presented the lowest Brix values, whereas higher values of Brix were observed in the samples that were inoculated with Triazo and IC26.

The general trend discussed above for the Brix values of the plants of families 6 and 37 was also observed for average stalk diameters (Fig. 1b), as the changes in stalk diameter due to inoculation also varied based on the family that was examined. Another example of this variance was the contrast between the plants of family 44 (RB925345×RB935686) and the plants of family 5

(RB99386×SP91-1049); for the plants of the former family, inoculation with Triazo produced greater average stalk diameters relative to the non-inoculated controls, whereas the non-inoculated control plants of the latter family displayed the thickest average stalks. These results indicated the importance of inoculating the plant during the initial phases of a sugarcane breeding program.

**Treatment×family interaction:** Table 6 lists the 10 best families with respect to the genotypic values and the

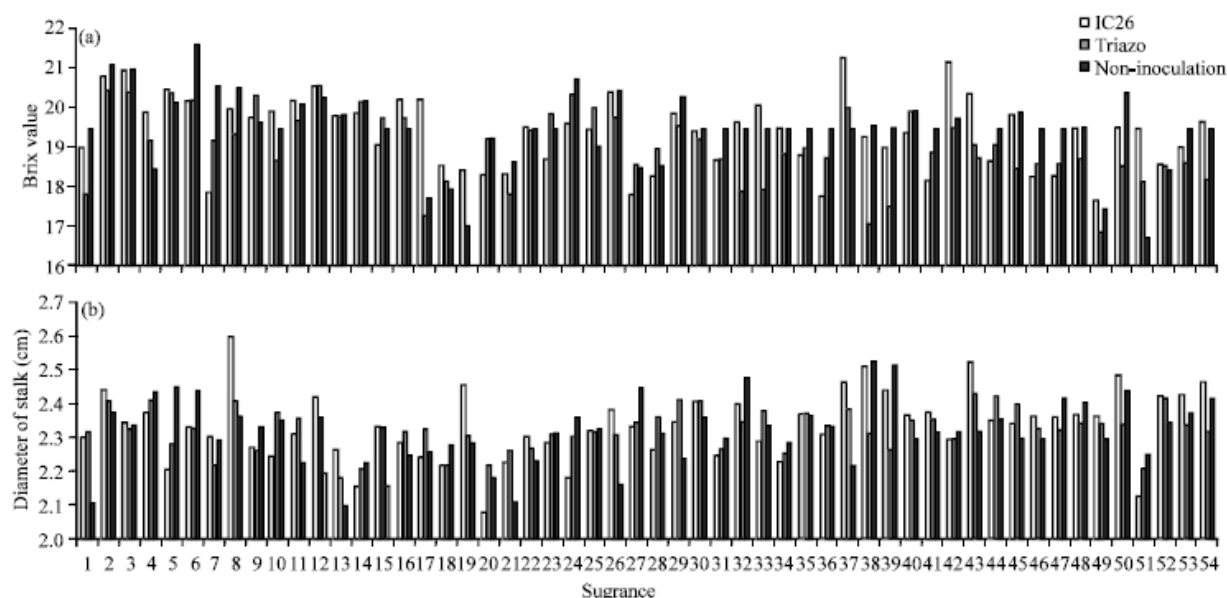


Fig. 1(a-b): (a) The genotypic value of Brix and (b) average stalk diameter of 54 families of sugarcane for each treatment (non-inoculated, inoculated with triazo and inoculated with IC26) after 14 months

values of family×treatment interactions. These values varied among the examined families and both negative and positive interaction values were observed for the same family, depending on the parameter that was evaluated.

One example is family 1 (H64-1881×RB92579), which presented a positive interaction with the Brix variable for control plants (0.382) but a negative interaction with the same variable in the plants that were inoculated with Triazo (-0.5514). A similar response was observed in family 6 (RB001922×RB92579), as the interaction with Brix was positive in the control plants (0.727) but negative in the plants that were treated with IC26 (-0.293).

Although, this selection phase presents a great number of genotypes and high genetic variability, it is possible to observe specific interactions between a family and an *A. brasilense* inoculant. For the same family, different *A. brasilense* inoculants may produce either positive or negative interactions from inoculations. For instance, the Brix values of the plants of family 24 (RB966922×polycross) were positively affected by inoculation with Triazo (0.299) and negatively impacted by inoculation with IC26 (-0.426), indicating that in this case, the response could vary based on the inoculant that was used. For this reason, studies with different inoculants are suggested.

## DISCUSSION

**Genetic differences among families:** The significant differences observed among families for all of the evaluated parameters were expected. During the first

selection phase of sugarcane breeding, the genetic variability of the population is high and this high variability indicates that conditions are favorable for selection (Ferreira *et al.*, 2005; Lopes *et al.*, 2008).

**The effect of inoculation on plant development:** We observed that inoculation produced significant differences in the traits of Brix, the average stalk length and the average stalk diameter. These results are consistent with the findings of Biari *et al.* (2008), who reported that maize responds differently to inoculation with PGPB depending on the characteristics that are evaluated. Ovando-Medina *et al.* (2007) observed that *Alpinia purpurata* plants inoculated with *A. brasilense* presented a greater stem diameter than non-inoculated controls.

On average, sugarcane plants that were inoculated exhibited a better response than non-inoculated plants (Table 4). Hungria *et al.* (2010) also observed variable increases in the productivity of wheat and maize plants that were inoculated with *A. brasilense* (strains Abv5, Abv6 and Abv7, among others) relative to plants that were not inoculated, indicating the positive effect of these bacterial strains in the plant development of these species.

The plants in this study exhibited a better average response to the IC26 inoculant than to the Triazo inoculant for the studied traits (average stalk length, average stalk diameter and Brix). This result was unexpected because associations with diverse bacterial

strains typically promote a greater response from plants, as demonstrated by various studies in the available literature (Oliveira *et al.*, 2002; Munir *et al.*, 2003; Baldani and Baldani, 2005; Oliveira *et al.*, 2009). In the present study, the interaction factor demonstrated that the inoculation response results can vary depending on the family that is examined.

As discussed by Baldani and Baldani (2005) the effect of inoculation on the productivity of plants is dependent on both the plant genotype and the bacterial strain that are used. Thus, different inoculation results are commonly obtained from experiments involving different bacterial strains or sugarcane genotypes. Munos-Rojas and Caballero-Mellado (2003) found diverse results for various productivity traits of sugarcane in an investigation in which they combined various cultivars with seven strains of *G. diazotrophicus*. In particular, these authors found that plants of the variety ME×57-473 that had been inoculated with the PA13 strain exhibited inferior values of shoot and root dry matter relative to non-inoculated controls. The superior values of these parameters that were observed in the plants that had not been inoculated indicated that the effect of an inoculation can be negative for certain cultivars.

A negative interaction with inoculation was also found in the B4362 sugarcane cultivar. In Brazil, B4362 is the only cultivar that is susceptible to mottled stripe disease, which is caused by the *Herbaspirillum rubrisubalbicans* bacterium (Olivares *et al.*, 1997). The inoculation of this cultivar with *Herbaspirillum rubrisubalbicans* results in the cultivar presenting the typical symptoms of mottled stripe disease. This result is consistent with the findings of Urquiaga *et al.* (1992), as these researchers suggested that plant genetic factors can control the bacterial processes of recognition, colonization and nitrogen fixation.

A specific interaction between sugarcane and *A. brasilense* was also observed in a study by Moutia *et al.* (2010), who inoculated two agronomically contrasting cultivars with *A. brasilense* (Azo 195, Azo 249 and Azo 274 strains). These authors observed that the cv. M 1176/77 responded positively to inoculation, whereas, the cv R 570 responded negatively, indicating that the plant genotype needs to be considered in situations involving bacterial inoculation; this result is consistent with the findings of the present study.

#### **The increase of solid soluble compounds (Brix) in plants:**

The significant differences observed Brix at 14 months after planting indicate that there was generally an increase in Brix in plants that were inoculated with an *A. brasilense* strain, although changes in this characteristic were also

significantly impacted by family-bacteria interaction factors (Table 3). More specifically, however, the association of three strains of *A. brasilense* (Triazo) with plants produced decreases in the average Brix of plants, whereas the IC26 inoculation promoted superior values compared with control treatments (T0, not inoculated) (Table 4).

Hari and Srinivasan (2005) observed that the inoculation of certain sugarcane varieties with different species of bacteria (*G. diazotrophicus*, *Azotobacter chroococcum* and *A. brasilense*) produced higher sugar content in those varieties; however, these authors did not mention the possible factors that may have influenced their results.

In the case of sugarcane, a better understanding of the photosynthetic metabolic processes and the transport and accumulation of metabolites, particularly sucrose, is required (Papini-Terzi *et al.*, 2009). It is possible that the higher values of Brix found in plants inoculated with IC26 are related to high nitrogen content, as this strain has constitutive nitrogenase activity; however, it has been found that the split application of N fertilizer at various rates has no significant effect on sugarcane characteristics (Koochekzadeh *et al.*, 2009).

The availability of organic N can strongly influence the photosynthesis capacity of plants (Donato *et al.*, 2004) and the higher chlorophyll content of sugarcane plants inoculated with *Azospirillum* (Zaied *et al.*, 2003; Bashan *et al.*, 2006) can be related to their higher photosynthetic rate (Wolff and Floss, 2004). However, additional studies should be conducted to clarify the higher sugar content of plants that have been inoculated with PGPB.

Due to the high number of genotypes evaluated, nitrogen analyses and other meticulous assessment techniques are not viable in the initial phases of the sugarcane breeding program; however, these analytical approaches are recommended for studies of advanced phases of the breeding program to confirm the results that have been obtained.

**Family×treatment interactions:** The results found in the present work showed significant interaction values between families and inoculation treatments. Certain families presented positive responses to inoculation, such as 4 (RB01616×H64-1881), 37 (RB867515×RB977619), 5 (RB99386×SP91-1049) and 9 (RB845210×RB931003) and some families had negative response 1 (H64-1881×RB92579), 6 (RB001922×RB92579) and 24 (RB966922×polycross).

Moutia *et al.* (2010) also found significant interaction values for the inoculation of two contrasting sugarcane cultivars, R570 and M1176/77, based on a study in which

these cultivars were either treated with an inoculant compound containing three *A. brasilense* strains or left as non-inoculated controls; cultivar performance was then assessed under distinct water regimes (either with or without stress). Although these authors used only one inoculant, the results that they found are consistent with the findings of the present research. In particular, the present study confirms the existence of specific interactions, both positive and negative, between bacteria of the genus *Azospirillum* and plants of various genotypes.

The interaction observed suggests that sugarcane genotype plays an important role in the success of the PGPB association with plants. Different authors identified genes involved in the recognition of beneficial or pathogenic interactions in sugarcane, such as the *SHR5* (Vinagre *et al.*, 2006) and *scGS1.b* genes which were differentially expressed in two contrasting sugarcane cultivars, SP70-1143 (high FBN) and Chuneé (low FBN) (Nogueira *et al.*, 2005).

The complex genetic structure of sugarcane, which contains duplicated chromosomes and lacks certain chromosomes (poly-aneuploidy), may contribute significantly to the high value of the interactions found in our work, given that the success of the association is sometimes dependent on a single gene. The distinct response of families to the PGPR treatment that is observed in the present work can be linked to the expression of these types of genes.

Other mechanisms are also related to the characteristics of a particular sugarcane cultivar (Baldani and Baldani, 2005), such as the interference of the sugarcane genotype on nitrogenase activity (Ruschel and Ruschel, 1977), the endogenous auxin concentrations and the sensitivity of plant tissues to auxin. In addition, various genotypes can display distinct capabilities for exuding carbon compounds in the rhizosphere (Kennedy, 1999; Hartmann *et al.*, 2008), diverse compounds in their root exudates (Moutia *et al.*, 2010) and variable capacities to reabsorb these exudates (Benizri *et al.*, 2001).

These aforementioned characteristics provide potential mechanisms to explain the variations found in the population of bacteria for each cultivar and the distinct responses of each genotype to inoculation with PGPB.

The significant results found for the interactions with the parameters of Brix and average diameter indicate that in this phase, it is already possible to identify and select families that may be more responsive to inoculation with PGPB. These families which are those that presented high or low interaction values, could be used in future research to discover new mechanisms related to the association

between plants and PGPB, as well as possible phenotypic traits or genotypic characteristics that allow for the identification of plants that have particularly positive or negative interactions with PGPB.

The results found in the present work not only put forth the possibility of selecting families and genotypes that are more responsive to bacterial inoculation but also suggest that this selection can be made with the objective of finding the specific ideal interaction between plant genotypes and bacterial strains.

## CONCLUSION

The results that were obtained in this work demonstrate that there were significant interactions between the *A. brasilense* strain and the various sugarcane families that were examined. Therefore, in a sugarcane breeding program that seeks to select genotypes with better responses to PGPB inoculation, the inoculation of the seedlings during the first phase of selection is recommended. Moreover, to optimize the interaction between PGPB and plants, the breeder must carefully choose the bacterial strain or strains to use in inoculations of the seedlings in question.

## ACKNOWLEDGMENTS

The authors are thankful to RIDESA (Rede Interuniversitária para o Desenvolvimento do Setor Sucroalcooleiro) for providing technical support, the experimental area and seeds. The authors would also like to thank CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Brazil) for the PhD fellowship of the first author and INCT-FBN/CNPq (Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia da Fixação Biológica de Nitrogênio, Brazil) for supporting the project that includes this study.

## REFERENCES

- Arzanesh, M.H., H.A. Alikhani, K. Khavazi, H.A. Rahimian and M. Miransari, 2009. In vitro growth of wheat (*Triticum aestivum* L.) seedlings, inoculated with *Azospirillum* sp. under drought stress. *Int. J. Botany*, 5: 244-249.
- Assmus, B., P. Hutzler, G. Kirchhof, R. Amann, J.R. Lawrence and A. Hartmann, 1995. In situ localization of *Azospirillum brasilense* in the rhizosphere of wheat with fluorescently labeled, rRNA-targeted oligonucleotide probes and scanning confocal laser microscopy. *Applied Environ. Microbiol.*, 61: 1013-1019.

- Baldani, I.J. and L.V. Baldani, 2005. History on the biological nitrogen fixation research in graminaceous plants: Special emphasis on the Brazilian experience. *Anais Da Acad. Brasileira De Ciencias Sci.*, 77: 549-579.
- Bashan, Y. and G. Holguin, 1997. *Azospirillum*-plant relationships: Environmental and physiological advances (1990-1996). *Can. J. Microbiol.*, 43: 103-121.
- Bashan, Y. and H. Levanony, 1990. Current status of *Azospirillum* inoculation technology: *Azospirillum* as a challenge for agriculture. *Can. J. Microbiol.*, 36: 591-608.
- Bashan, Y. and L.E. Bashan, 2011. How the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum* promotes plant growth: A critical assessment. *Adv. Agron.*, 108: 77-136.
- Bashan, Y., G. Holguin and L.E. de-Bashan, 2004. *Azospirillum*-plant relationship: Physiological, molecular, agricultural and environmental advances (1997-2003). *Can. J. Microbiol.*, 50: 521-577.
- Bashan, Y., J.J. Bustillos, L.A. Leyva, J.P. Hernandez and M. Bacilio, 2006. Increase in auxiliary photoprotective photosynthetic pigments in wheat seedlings induced by *Azospirillum brasilense*. *Biol. Fertility Soils*, 42: 279-285.
- Bashan, Y., K. Harrison and R. Whitmoyer, 1990. Enhanced growth of wheat and soybean plants inoculated with *Azospirillum brasilense* is not necessarily due to general enhancement of mineral uptake. *Applied Environ. Microbiol.*, 56: 769-775.
- Benizri, E., E. Baudoin and A. Guckert, 2001. Root colonization by inoculated plant growth promoting rhizobacteria. *Biocontrol. Sci. Technol.*, 11: 557-574.
- Biari, A., A. Gholami and H.A. Rahmani, 2008. Growth promotion and enhanced nutrient uptake of maize (*Zea mays* L.) by application of plant growth promoting rhizobacteria in Arid region of Iran. *J. Biol. Sci.*, 8: 1015-1020.
- Broek, A.V., J. Michiels, A. van Gool and J. Vanderleuden, 1993. Spatial-temporal colonization patterns of *Azospirillum brasilense* on the wheat root surface and expression of the bacterial nif H gene during association. *Mol. Plant-Microbe Interactions*, 6: 592-600.
- Coelho, C.H.M., A.F.A. Medeiros, J.C. Polidoro, R.P. Xavier and A. Resende *et al.*, 2003. Identification of genotypes of sugar cane with respect to their potential contribution from biological nitrogen fixation. *Agronomia*, 37: 37-40.
- De Mendonca, M.M., S.S. Urquiaga and V.M. Reis, 2006. Genotypic variability of maize for nitrogen accumulation and contribution of biological nitrogen fixation. *Pesquisa Agropecuaria brasileira*, 41: 1681-1685.
- De Oliveira, A.L.M., E.L. Canuto, S. Urquiaga, V.M. Reis and J.I. Baldani, 2006. Yield of micropropagated sugarcane varieties in different soil types following inoculation with diazotrophic bacteria. *Plant Soil*, 284: 23-32.
- De Resende, M.D.V., 2006. O software selegen-Reml/Blup. Documents EMBRAPA Campo Grande, National Institute of Intellectual Property, [http://www.incaper.es.gov.br/congressos/cbmp/apresentacoes/minicursos/Minicurso2\\_SelegenManual.pdf](http://www.incaper.es.gov.br/congressos/cbmp/apresentacoes/minicursos/Minicurso2_SelegenManual.pdf)
- Dobereiner, J. and J.M. Day, 1976. Associative symbiosis in tropical grass: Characterization of microorganisms and dinitrogen-fixing sites. Proceedings of the International Symposium on N<sub>2</sub> Fixation, September 13-17, 1976, Washington State University, pp: 518-537.
- Donato, V.M.T.S., A.G. de Andrade, E.S. de Souza, J.G.E. de Franca and G.A. Maciel, 2004. Enzymatic activity in sugar cane varieties cultivated *in vitro* under nitrogen levels. *Pesquisa Agropecuaria brasileira*, 39: 1087-1093.
- FAO, 2006. World Reference Base for Soil Resources. Food and Agriculture Organization, Rome, Pages: 145.
- Ferreira, F.M., M.H.P. Barbosa, R.D. Castro, L.A. Patemelli and C.D. Cruz, 2005. Effects of inbreeding on the selection of sugar cane clones. *Crop Breed. Applied Biotechnol.*, 53: 174-182.
- Hari, K. and T.R. Srinivasan, 2005. Response of sugarcane varieties to application of nitrogen fixing bacteria under different nitrogen levels. *Sugar Tech.*, 7: 28-31.
- Hartmann, A., M. Schmid, D. van Tuinen and G. Berg, 2008. Plant-driven selection of microbes. *Plant Soil*, 321: 235-257.
- Hungria, M., R.J. Campo, E.M. Souza and F.O. Pedrosa, 2010. Inoculation with selected strains of *Azospirillum brasilense* and *A. lipoferum* improves yields of maize and wheat in Brazil. *Plant Soil*, 331: 413-425.
- IAPAR, 1994. Climatic Letters of Parana State. Instituto Agronomico do Parana, Londrina, pp: 49.
- Kennedy, A.C., 1999. Bacterial diversity in agroecosystems. *Agric. Ecosyst. Environ.*, 74: 65-76.
- Keyeo, F., O.N. Aï shah and H.G. Amir, 2011. The effects of nitrogen fixation activity and phytohormone production of diazotroph in promoting growth of rice seedlings. *Biotechnology*, 10: 267-273.
- Koochekzadeh, A., G. Fathi, M.H. Gharineh, S.A. Siadat, S. Jafari and Kh. Alami-Saeid, 2009. Impacts of rate and split application of n fertilizer on sugarcane quality. *Int. J. Agric. Res.*, 4: 116-123.
- Ladha, J.K., A. Tirol-Padre, G.C. Punzalan and I. Watanabe, 1987. Nitrogen-fixing (C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>-reducing) activity and plant growth characters of 16 wetland rice varieties. *Soil Sci. Plant Nutr.*, 32: 91-106.

- Lopes, V.R., J.C. Bessalho Filho, R.A. Oliveira, E.P. Guerra, J.L.C. Zambon and E. Daros, 2008. Genetic divergence and parent selection of sugarcane clones. *Crop Breed. Applied Biotechnol.*, 8: 225-231.
- Moutia, J.F.Y., S. Saumtally, S. Spaepen and J. Vanderleyden, 2010. Plant growth promotion by *Azospirillum* sp. in sugarcane is influenced by genotype and drought stress *Plant Soil*, 337: 233-242.
- Munir, A., I. Munir, S. Afrasyab and S. Hasnain, 2003. Growth stimulatory effects of *Azospirillum* strains on *Triticum aestivum* and *Vigna radiata*. *Biotechnology*, 2: 198-205.
- Munos-Rojas, J. and J. Caballero-Mellado, 2003. Population dynamics of *Gluconacetobacter diazotrophicus* in sugarcane cultivars and effect on plant growth. *Microbiol. Ecol.*, 45: 454-464.
- Nogueira, E. de M., F.L. Olivares, J.C. Japiassu, C. Vilar, F. Vinagre, J.I. Baldani and A.S. Hemery, 2005. Characterization of glutamine synthetase genes in sugarcane genotypes with different rates of biological nitrogen fixation. *Plant Sci.*, 169: 819-832.
- Olivares, F.L., E.K. James, J.I. Baldani and J. Dobereiner, 1997. Infection of mottled stripe disease-susceptible and resistant sugar cane varieties by the endophytic diazotrophic *Herbaspirillum*. *New Phytol.*, 135: 723-737.
- Oliveira, A.L.M., M. Stoffels, M. Schmid, V.M. Reis, J.I. Baldani and A. Hartmann, 2009. Colonization of sugarcane plantlets by mixed inoculations with diazotrophic bacteria. *Eur. J. Soil Biol.*, 45: 106-113.
- Oliveira, A.L.M., S. Urquiaga, J. Dobereiner and J.I. Baldani, 2002. The effect of inoculating endophytic N<sub>2</sub>-fixing bacteria on micropropagated sugarcane plants. *Plant Soil*, 242: 205-215.
- Ovando-Medina, I., L. Adriano-Anaya, A. Chavez-Aguilar and A. Oliva-Llaven *et al.*, 2007. Ex vitro survival and early growth of *Alpinia purpurata* plantlets inoculated with *Azotobacter* and *Azospirillum*. *Pak. J. Biol. Sci.*, 10: 3454-3457.
- Pedrinho, E.A.N., R.F. Galdiano Jr., J.C. Campanharo, L.M.C. Alves and E.G.M. Lemos, 2010. Identification and evaluation of bacteria isolated from roots of maize. *Bragantia*, 69: 905-912.
- Ruschel, A.P. and R. Ruschel, 1977. Varietal differences affecting nitrogenase activity in rhizosphere of sugar cane. *Proc. Int. Soc. Sugar Cane Technol.*, 214: 1941-1947.
- Sala, V.M.R., E.J.B.N. Cardoso, J.G. De Freitas and A.P.D. Da Silveira, 2007. Wheat genotypes response to inoculation of diazotrophic bacteria in field conditions. *Pesquisa Agropecuaria brasileira*, 42: 833-842.
- Schlöter, M. and A. Hartmann, 1998. Endophytic and surface colonization of wheat roots (*Triticum aestivum*) by different *Azospirillum brasilense* strains studied with strain-specific monoclonal antibodies. *Symbiosis*, 25: 159-179.
- Shaukat, K., S. Afrasyab and S. Hasnain, 2006. Growth responses of *Triticum aestivum* to plant growth promoting rhizobacteria used as a biofertilizer. *Res. J. Microbiol.*, 1: 330-338.
- Tarrand, J.J., N.R. Krieg and J. Dobereiner, 1978. A taxonomic study of the *Spirillum lipoferum* group, with descriptions of a new genus, *Azospirillum* gen. nov. and two species, *Azospirillum lipoferum* (Beijerinck) comb. nov. and *Azospirillum brasilense* sp. nov. *Canadian J. Microbiol.*, 24: 967-980.
- Urquiaga, S., K.H.S. Cruz and R.M. Boddey, 1992. Contribution of nitrogen fixation to sugarcane: N and nitrogen balance estimates. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 56: 105-114.
- Verma, J.P., J. Yadav, K.N. Tiwari, Lavakush and V. Singh, 2010. Impact of plant growth promoting rhizobacteria on crop production. *Int. J. Agric. Res.*, 5: 954-983.
- Vinagre, F., C. Vargas, K. Schwarcz, J. Cavalcante and E.M. Nogueira *et al.*, 2006. SHR5: A novel plant receptor kinase involved in plant-N<sub>2</sub>-fixing endophytic bacteria association. *J. Exp. Bot.*, 57: 559-569.
- Wolff, W.M. and E.L. Floss, 2004. Correlation among nitrogen and chlorophyll contents of leaves and grain yield of oat. *Ciencia Rural*, Santa Maria, 38: 1510-1515.
- Zaied, K.A., A.H. Abd El-Hady, H. Aida Afify and M.A. Nassef, 2003. Yield and nitrogen assimilation of winter wheat inoculated with new recombinant inoculants of rhizobacteria. *Pak. J. Biol. Sci.*, 6: 344-358.

## **ANEXO II**



Anexo II: População de bactérias nos tecidos das raízes, rizomas e colmos da melhor (F21) e da pior família (F8) de cana-de-açúcar, escolhidas com base nas análises biométricas. Amostras compostas por três plantas de cada tratamento (Triazo, IC26 e Não Inoculado), isoladas aos 14 meses após o plantio.

Amostra	Família	Região	Tratamento	Bloco (Repetição)	Concentração
1	F21	Colmo	CONTROLE	R1	$0,4 \cdot 10^2$
2				R2	$4,5 \cdot 10^6$
3				R3	$0,4 \cdot 10^2$
4			IC26	R1	$0,9 \cdot 10^2$
5				R2	$2,5 \cdot 10^4$
6				R3	$0,4 \cdot 10^2$
7			TRIAZO	R1	$0,9 \cdot 10^2$
8				R2	$1,4 \cdot 10^7$
9				R3	$2,5 \cdot 10^2$
10		Raiz	CONTROLE	R1	$2,5 \cdot 10^2$
11				R2	$2,5 \cdot 10^2$
12				R3	$2,5 \cdot 10^2$
13			IC26	R1	$2,5 \cdot 10^2$
14				R2	$0,4 \cdot 10^2$
15				R3	$0,9 \cdot 10^2$
16			TRIAZO	R1	$2,5 \cdot 10^2$
17				R2	$4,5 \cdot 10^4$
18				R3	$2,5 \cdot 10^2$
19		Rizoma	CONTROLE	R1	$2,5 \cdot 10^2$
20				R2	$9,5 \cdot 10^4$
21				R3	$4 \cdot 10^4$
22			IC26	R1	$1,5 \cdot 10^4$
23				R2	0
24				R3	$2,5 \cdot 10^2$
25			TRIAZO	R1	$4,5 \cdot 10^4$
26				R2	$4 \cdot 10^2$
27				R3	$9,5 \cdot 10^4$

Amostra	Família	Região	Tratamento	Bloco (Repetição)	Concentração
1	F8	Colmo	CONTROLE	R1	$4,5*10^4$
2				R2	$0,3*10^2$
3				R3	$0,7*10^4$
4			IC26	R2	$2,5*10^2$
5				R2	$0,9*10^2$
6				R3	$0,4*10^2$
7			TRIAZO	R1	$2,5*10^2$
8				R2	$0,4*10^2$
9				R3	0
10		Raiz	CONTROLE	R1	$2,5*10^2$
11				R2	$0,4*10^2$
12				R3	$2,5*10^2$
13			IC26	R1	$2,5*10^2$
14				R2	$0,4*10^2$
15				R3	$2,5*10^2$
16			TRIAZO	R1	$9,5*10^4$
17				R2	$1,1*10^4$
18				R3	$4,5*10^4$
19		Rizoma	CONTROLE	R1	$9,5*10^4$
20				R2	$0,4*10^2$
21				R3	$2*10^4$
22			IC26	R1	$2,5*10^2$
23				R2	$0,4*10^2$
24				R3	$4,5*10^4$
25			TRIAZO	R1	$2,5*10^2$
26				R2	$4,5*10^4$
27				R3	$2,5*10^2$

### **ANEXO III**

Anexo III: Valores de interação família x tratamento (FxT) das 54 famílias estudadas nos 3 diferentes tratamentos (Não Inoculado, Triazo e IC26), após 14 meses – Experimento T1 da série 2008.

<b>F x T</b>	<b>Valor da Interação</b>	<b>F x T</b>	<b>Valor da Interação</b>	<b>F x T</b>	<b>Valor da Interação</b>	<b>F x T</b>	<b>Valor da Interação</b>
1 X TRIAZO	-0,5514	14 X IC26	-0,0823	27 X T0	0,0608	41 X TRIAZO	0,1085
1 X IC26	0,0699	14 X T0	0,0854	28 X TRIAZO	0,2301	41 X IC26	-0,2728
1 X T0	0,3819	15 X TRIAZO	0,5192	28 X IC26	-0,2748	41 X T0	-0,0526
2 X TRIAZO	0,1451	15 X IC26	-0,1361	28 X T0	-0,0838	42 X TRIAZO	-0,0809
2 X IC26	0,0897	15 X T0	-0,3662	29 X TRIAZO	-0,0952	42 X IC26	0,593
2 X T0	0,213	16 X TRIAZO	0,1802	29 X IC26	0,1254	42 X T0	-0,2497
3 X TRIAZO	0,0885	16 X IC26	0,2552	29 X T0	0,2066	43 X TRIAZO	-0,1582
3 X IC26	0,1692	16 X T0	-0,2531	30 X TRIAZO	0,0693	43 X IC26	0,4565
3 X T0	0,194	17 X TRIAZO	-0,0929	30 X IC26	-0,0324	43 X T0	-0,1622
4 X TRIAZO	0,073	17 X IC26	-0,7556	30 X T0	0,0322	44 X IC26	-0,1182
4 X IC26	0,4341	17 X T0	0,2721	31 X TRIAZO	-0,0641	44 X T0	-0,0517
4 X T0	-0,5045	18 X TRIAZO	-0,0543	31 X IC26	-0,1814	45 X TRIAZO	-0,2593
5 X TRIAZO	0,2874	18 X IC26	0,0767	31 X T0	0,1408	45 X IC26	0,2124
5 X IC26	0,1383	18 X T0	-0,2488	32 X TRIAZO	-0,2906	45 X T0	0,1011
5 X T0	-0,1036	19 X TRIAZO	-0,3098	32 X IC26	0,2007	46 X TRIAZO	-0,0799
6 X TRIAZO	-0,0413	19 X IC26	0,4025	32 X T0	-0,0658	46 X IC26	-0,2344
6 X IC26	-0,2932	19 X T0	-0,5424	33 X TRIAZO	-0,2086	46 X T0	0,1501
6 X T0	0,7272	20 X TRIAZO	0,291	33 X IC26	0,3976	47 X T0	0,0122
7 X TRIAZO	0,068	20 X IC26	-0,5106	33 X T0	-0,3776	48 X TRIAZO	-0,2292
7 X IC26	-0,9125	20 X T0	0,1714	34 X TRIAZO	0,0493	48 X IC26	0,0833
7 X T0	0,8695	21 X TRIAZO	-0,0076	34 X IC26	0,4162	48 X T0	0,1736
8 X TRIAZO	-0,1858	21 X IC26	-0,5622	34 X T0	-0,6025	49 X TRIAZO	-0,3884
8 X IC26	0,0047	21 X T0	0,2526	35 X TRIAZO	0,2806	49 X IC26	-0,1588
8 X T0	0,4061	22 X TRIAZO	0,1454	35 X IC26	0,1181	49 X T0	0,0028

Continua...

9 X TRIAZO	0,3047	22 X IC26	0,097	35 X T0	-0,5729	50 X TRIAZO	-0,4428
9 X IC26	-0,0461	22 X T0	-0,1945	36 X TRIAZO	-0,0243	50 X IC26	0,0118
9 X T0	-0,0968	23 X TRIAZO	0,3674	36 X IC26	-0,3982	50 X T0	0,5253
10 X TRIAZO	-0,202	23 X IC26	-0,3695	36 X T0	0,1472	51 X TRIAZO	0,1584
10 X IC26	0,289	23 X T0	0,0856	37 X TRIAZO	0,0886	51 X IC26	-0,1782
10 X T0	-0,0146	24 X TRIAZO	0,2991	37 X IC26	0,6071	51 X T0	-0,482
11 X TRIAZO	-0,0081	24 X IC26	-0,4265	37 X T0	-0,4287	52 X TRIAZO	0,0579
11 X IC26	0,1679	24 X T0	0,4156	38 X TRIAZO	-0,8665	52 X IC26	-0,0877
11 X T0	0,0797	25 X TRIAZO	0,4866	38 X IC26	0,2385	52 X T0	-0,126
12 X TRIAZO	0,3069	25 X IC26	-0,1261	38 X T0	0,4977	53 X TRIAZO	0,0527
12 X IC26	0,114	25 X T0	-0,2485	39 X TRIAZO	-0,4338	53 X IC26	0,3336
12 X T0	-0,0762	26 X TRIAZO	-0,0898	39 X IC26	0,2008	53 X T0	-0,597
13 X TRIAZO	0,1514	26 X IC26	0,1862	40 X TRIAZO	0,2627	54 X TRIAZO	-0,2901
13 X IC26	0,0082	26 X T0	0,1798	40 X IC26	-0,21	54 X IC26	0,2755
13 X T0	0,0125	27 X TRIAZO	0,1298	40 X T0	0,123	54 X T0	-0,0179
14 X TRIAZO	0,2531	27 X IC26	-0,4056	-	-	-	-